



Analyse du coût de virulence chez *Plasmopara halstedii*, l'agent du mildiou du tournesol

Nachaat Sakr

► To cite this version:

Nachaat Sakr. Analyse du coût de virulence chez *Plasmopara halstedii*, l'agent du mildiou du tournesol. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2008. Français. NNT : 2008CLF21835 . tel-00729681

HAL Id: tel-00729681

<https://theses.hal.science/tel-00729681>

Submitted on 7 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D.U. : 1835



UNIVERSITE D'Auvergne
Année 2008

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire

Soutenue le 26 juin 2008

Nachaat SAKR

**Analyse du coût de virulence chez *Plasmopara halstedii*, l'agent
du mildiou du tournesol**

Président et Rapporteur: M. Grégory DECHAMP-GUILLAUME Pr. ENSA Toulouse
Rapporteur : M^{me} Marie France CORIO-COSTET Dr. INRA Bordeaux
Examineur : M^{me}Emmanuelle MESTRIES Dr. CETIOM Toulouse
Examineur : M^{lle} Félicity VEAR Dr. INRA Clermont
Codirecteur de Thèse : M^{me} Mireille DUCHER Dr. Univ. B. Pascal Clermont II
Codirecteur de Thèse : M. Denis TOURVIEILLE de LABROUHE Dr. INRA Clermont

UMR 1095 INRA-UBP « Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales »

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé à l'UMR '**Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales**' de l'**Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)** à **Clermont-Ferrand**. Je tiens à remercier Dr Gilles **CHARMET** pour son accueil.

Je voudrais remercier la **Commission à l'Energie Atomique** en **Syrie** qui a financé mes séjours en France.

Ma profonde reconnaissance va à Professeur Grégory **DECHAMP-GUILLAUME** qui me fait l'honneur de présider le jury et d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail.

Je remercie vivement Dr Marie France **CORIO-COSTET** d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail. Je remercie Dr Emmanuelle **MESTRIES** pour ses conseils scientifiques dans la rédaction de cette thèse. Je remercie également Dr François **DELMOTTE** pour réaliser des analyses moléculaires sur des souches de *Plasmopara halstedii*.

Je tiens à remercier Dr Mireille **UCHER** et Dr Denis **TOURVIEILLE de LABROUHE**, pour avoir dirigé ce travail et pour leurs conseils scientifiques.

Que Dr Felicity **VEAR** soit remerciée pour ses précieux conseils techniques et scientifiques et pour sa gentillesse.

Je remercie Dr Jeanne **TOURVIEILLE** pour m'avoir fourni les matériels fongiques qui ont permis la réalisation de ce travail et pour les discussions très enrichissantes.

Un remerciement particulier va à Annick **UDIN** et Pascal **WALSER** pour leur gentillesse et leur générosité, leurs précieuses corrections en orthographe et grammaire qui ont enrichi mes connaissances en langue française.

Un grand merci à Zohra **FORTAS**, Gérard **CHEVALIER** et Dominique **MABRU**, sans oublier la regrettée Chantal **DUPRE** pour les discussions très enrichissantes que j'ai pu avoir avec eux. Je remercie également Sylvie **ROCHE**, Frédéric **SERRE**, Ali **JALT** et l'équipe des serristes de l'unité pour leur gentillesse et leur collaboration à mon travail.

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphisme
AIA	Acide Indole Acétique
EST	Expressed Sequence Tag
ITS	Internal Transcribed Spacer
LRR	Leucin Rich Repeats
NBS	Nucleotide Binding Site
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
QTL	Quantitative Trait Loci
RADP	Random Amplified Polymorphic DNA

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	4
I – Le pouvoir pathogène chez les champignons pathogènes des plantes.....	4
I – 1 – Définitions.....	4
I – 1 – 1 – L’ « agressivité ».....	5
I – 1 – 2 – La « virulence ».....	6
I – 2 – Coût de la virulence superflue.....	7
I – 3 – Moyens d’étude de l’agressivité chez les champignons pathogènes.....	8
I – 3 – 1 – Le pathosystème <i>Phytophthora infestans</i> / <i>Solanum tuberosum</i> ..	8
I – 3 – 2 – Le pathosystème <i>Bremia lactucae</i> / <i>Lactuca spp</i>	9
I – 3 – 3 – Le pathosystème <i>Puccinia graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> / <i>Triticum aestivum</i>	10
I – 3 – 4 – Le pathosystème <i>Alternaria brassicicola</i> / <i>Cakile maritima</i>	10
I – 4 – Relations entre l’agressivité et la pression de sélection exercée par les gènes de résistance de la plante hôte.....	11
I – 5 – Relations entre l’agressivité et les conditions environnementales.....	12
I – 5 – 1 – L’hivernage des pathogènes.....	12
I – 5 – 2 – Le stress hydrique.....	12
I – 6 – Relations entre l’agressivité et la sensibilité aux fongicides.....	13
I – 7 – Relations entre l’agressivité et la diversité génétique.....	14
II – Les mécanismes de la résistance des plantes.....	15
II – 1 – Résistance verticale.....	16
II – 2 – Résistance horizontale.....	17
II – 3 – Durabilité de la résistance	18
II – 4 – Potentialités évolutives des populations de pathogènes.....	20
II – 5 – Relations entre la durabilité de la résistance et la pression de sélection exercée par l’hôte.....	21
III – Le couple <i>Plasmopara halstedii</i> / <i>Helianthus annuus</i>	22

III – 1 – Tournesol.....	22
III – 2 – Mildiou du tournesol.....	23
III – 2 – 1 – Biologie de <i>P. halstedii</i>	24
III – 2 – 2 – Races de <i>P. halstedii</i>	24
III – 2 – 3 – Variabilité morphologique chez <i>P. halstedii</i>	25
III – 2 – 4 – Variabilité moléculaire chez <i>P. halstedii</i>	26
III – 2 – 5 – Modalités de l'infection et les symptômes de la maladie.....	27
- La contamination primaire.....	27
- La contamination secondaire.....	27
III – 2 – 6 – Moyens de lutte dans le pathosystème <i>P. halstedii</i> / <i>H. annuus</i>	28
III – 2 – 6 – 1 – La lutte culturale.....	28
III – 2 – 6 – 2 – La lutte chimique.....	28
III – 2 – 6 – 3 – La lutte génétique.....	29
MATÉRIELS ET MÉTHODES	32
I – Origine du matériel expérimental.....	32
I – 1 – Hybrides de tournesol.....	32
I – 2 – Dispositif expérimental.....	33
I – 3 – Souches DU xxxx récoltées dans les parcelles.....	34
I – 4 – Situation sanitaire.....	34
II – Matériel végétal.....	35
III – Conditions de réalisation des tests	35
IV – Méthodes.....	36
IV – 1 – Méthode pour obtenir des isolats monozospores.....	36
IV – 2 – Méthode pour mesurer l'agressivité.....	36
IV – 2 – Analyses statistiques.....	37
RÉSULTATS.....	38

Article 1 : Mise au point d'une nouvelle méthode d'obtention de souches zonozoosporanges.....	40
Bilan.....	50
Article 2 : Mise au point d'une méthode pour mesurer l'agressivité chez <i>Plasmopara halstedii</i>	51
Bilan.....	60
Article 3: Etude de la variabilité morphologique des zoosporanges de <i>Plasmopara halstedii</i>	61
Bilan.....	78
Article 4 : Etude de l'agressivité de différentes races de <i>Plasmopara halstedii</i>	79
Bilan.....	96
Article 5 : Effets des différentes méthodes de gestion des gènes <i>PI</i> sur l'agressivité de <i>Plasmopara halstedii</i>	97
Bilan.....	103
DISCUSSION GÉNÉRALE PERSPECTIVES.....	104
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	111
ANNEXE Validation des conditions de culture.....	131

Tableau 1 - Réponse de la plante associée à l'interaction de couple de gènes suivant le modèle "gène pour gène". Modèle génétique dans le cas de deux organismes diploïdes (selon Tourvieille de Labrouhe *et al.*, (2000)).

Génotype de la plante Génotype du pathogène		Génotype 1 $\frac{R1}{/} \frac{r2}{r2}$	Génotype 2 $\frac{r1}{r1} \frac{R2}{/}$
Race 1	$\frac{Avr1}{/} \frac{avr2}{avr2}$	Résistance (réaction incompatible)	Sensibilité (réaction compatible)
Race 2	$\frac{avr1}{avr1} \frac{Avr2}{/}$	Sensibilité (réaction compatible)	Résistance (réaction incompatible)

Tableau 2- Facteurs de risque intervenant dans l'évolution des pathogènes (selon : McDonald et Linde, 2002).

Risque plus élevé de l'évolution	Risque moins élevé de l'évolution
Taux élevé de mutation	Taux faible de mutation
Il existe des éléments transposables	Pas d'éléments transposables
Grand effectif de la population	Faible effectif de la population
Grand effectif des populations hivernantes	Pas de propagules hivernantes
Extinction locale est rare	Extinction des populations locales fréquente
Pas de dérive génétique	Dérive génétique significative
Introduction des gènes élevée	Introduction des gènes limitée
Propagules asexuées se dispersant par l'air à de grandes distances	Propagules asexuées se dispersant par la terre
Déplacement sur de grande distance par les hommes	
Système mixte de reproduction	Système de reproduction asexuée
Croisement extérieur et régulier et production des spores sexuées	Production de spores ou propagules asexuées
Sélection directe	Sélection perturbante
Gènes 'R' s'exprimant en monoculture génétique uniforme	Gènes 'R' s'exprimant en mélange
	Gènes 'R' s'exprimant en rotations en temps et espace

Le système mixte de reproduction	E L E V E (3)	<i>Phytophthora soja</i> 3	<i>Mycosphaerella graminicola</i> 6	<i>Phytophthora infestans</i> 9
Le système sexué de reproduction	M O Y E N (2)	<i>Armillaria mellea</i> 2	<i>Tilletia spp</i> 4	
Le système asexué de reproduction	F A I B L E (1)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i> 1	<i>Erwinia amylovora</i> 2	<i>Puccinia striiformis</i> 3
le type de Reproduction		FAIBLE (1)	MOYENNE (2)	ELEVEE (3)
les flux des gènes		Les propagules se dispersent par la terre, difficile à se disperser ~ 5 mètres de la dispersion totale	Les propagules se dispersant par l'eau, la dispersion est moyenne ~ 100 mètres – dans le champ	Les propagules se dispersent par l'air. Facile à se disperser ~ 10 – 1000 km

Figure 1 : Echelle d'évolution du risque faisant intervenir le type de reproduction et les flux de gènes (selon : McDonald et Linde, 2002).

Tableau 3: Surface cultivée (1000 ha), production (1000 tonnes) et rendement (quintaux /ha) de tournesol en France de 2000 à 2007 (selon SIDO/ONIOL/ONIGC et ONIDOL).

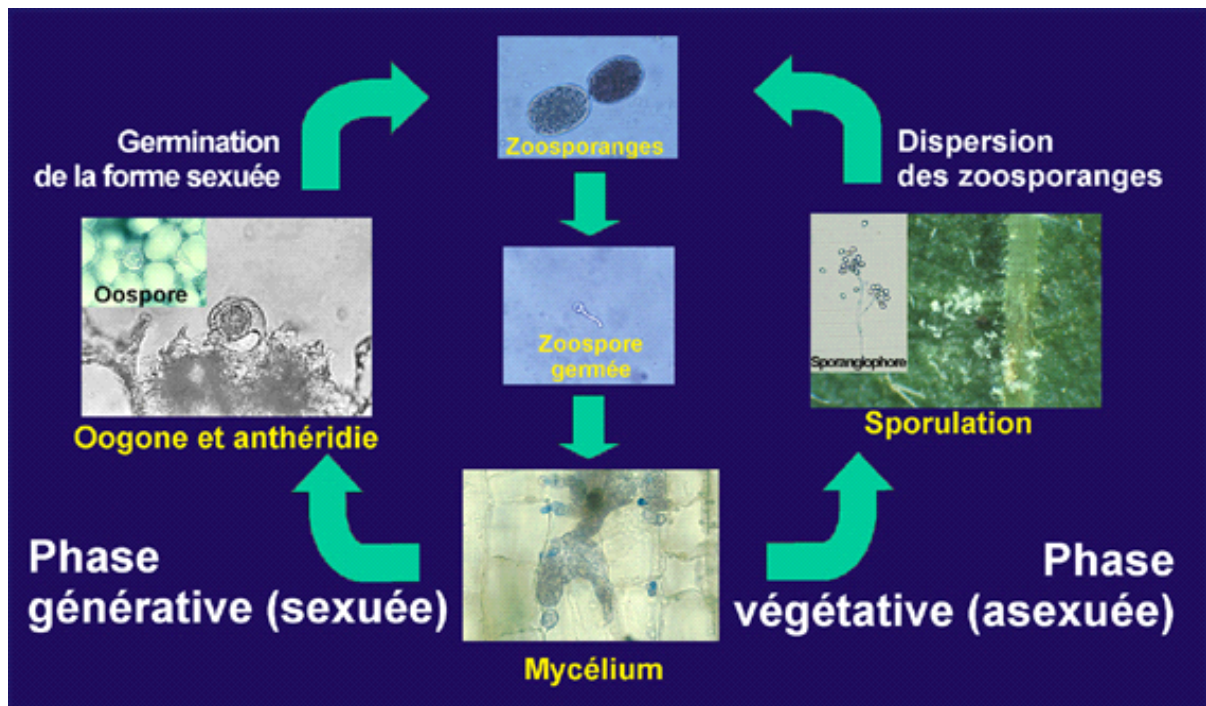
Tournesol	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Surface	710	706	616	691	614	646	641	540
Production	1813	1581	1497	1492	1444	1528	1441	1269
Rendemen	25,5	22,4	24,3	21,6	23,5	23,8	22,5	23,5
t								

Tableau 4: Surface cultivée (1000 ha) en tournesol en UE (selon Eurostat et Commission UE-COCERAL).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Allemagne	25	26	25	37	32	27	28	26
Espagne	841	861	754	790	750	517	600	613
Italie	248	208	166	151	124	130	145	130
Hongrie	-	-	-	-	481	511	525	470
Total UE	-	-	-	-	2204	2008	2131	3399

Tableau 5: Production (1000 tonnes) de tournesol en UE (selon Eurostat et Commission UE-COCERAL).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Allemagne	57	54	52	73	70	67	66	64
Espagne	848	871	771	769	785	361	552	674
Italie	766	411	354	237	274	289	331	300
Hongrie	-	-	-	-	1119	1108	1181	1058
Total UE	-	-	-	-	4109	3716	3948	5660



(Meliala, 2001)

Figure 2 : Cycle biologique de *P. halstedii* (selon Meliala, 2001)

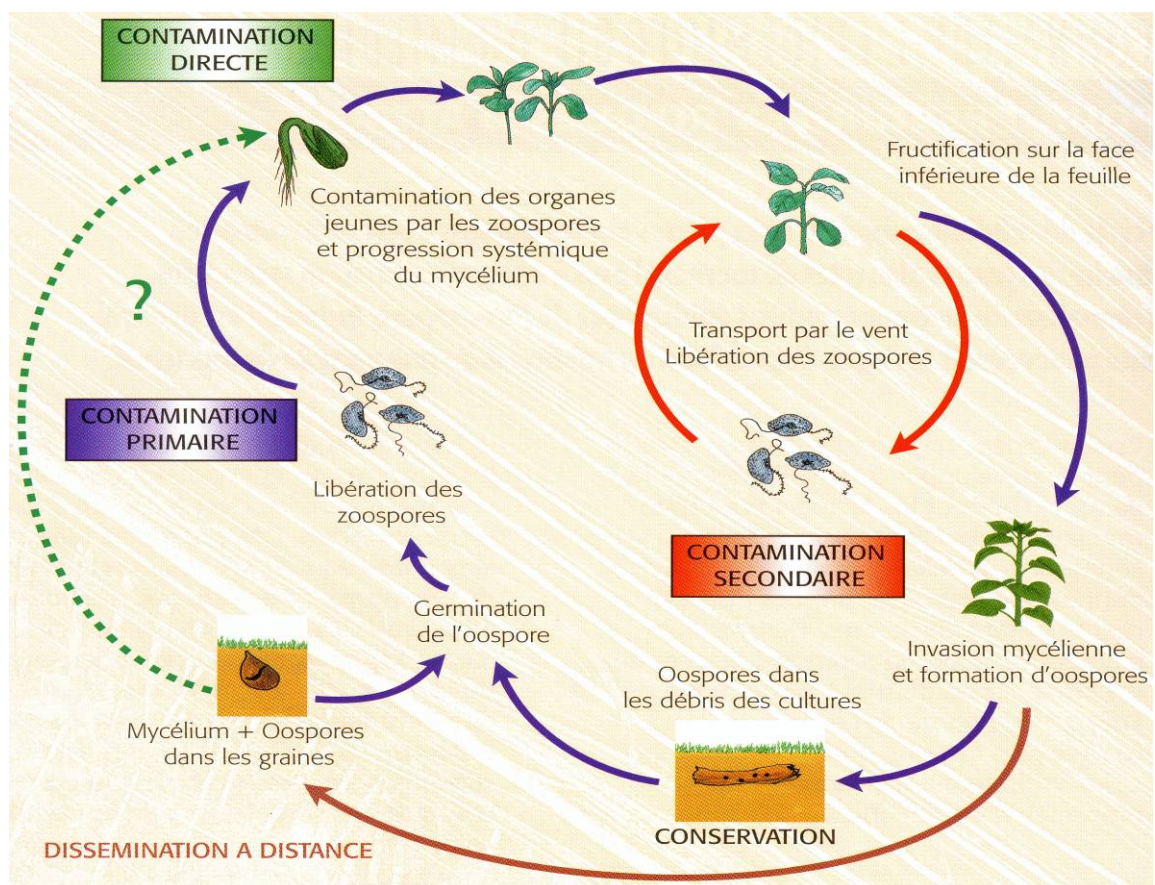


Figure 3 : Cycle infectieux de *P. halstedii* (selon Tourvieille de Labrouhe *et al.*, (2000))



Figure 4 : Symptômes sur les feuilles de la contamination primaire (photos INRA), dans des conditions contrôlées (gauche), dans des conditions naturelles (droite).



Figure 5 : Symptômes sur les feuilles de la contamination secondaire (photos INRA), attaques très précoces (gauche), attaques précoces (centre), attaques tardives (droite).

Tableau 8 : Dispositif pluriannuel d'étude de l'impact du mode de gestion des gènes *Pl* de résistance du tournesol sur l'évolution du mildiou ; H1, H2, H3 et H4 sont 4 hybrides quasi-isogéniques se distinguant par leur construction de résistance à *Plasmopara halstedii* (selon Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005).

Années	Assemblage	Alternance	Référence	Parcelles		
				Monoculture	Monoculture	Monoculture
				H2	H3	H4
n	H1+H2+H3+H4	H1	H1	H2	H3	H4
n+1	H1+H2+H3+H4	H2	H1	H2	H3	H4
n+2	H1+H2+H3+H4	H3	H1	H2	H3	H4
n+3	H1+H2+H3+H4	H4	H1	H2	H3	H4



Figure 6 : Culture du tournesol sous tunnels pour étudier l'impact des gènes *Pl* sur l'évolution de *Plasmopara halstedii*.

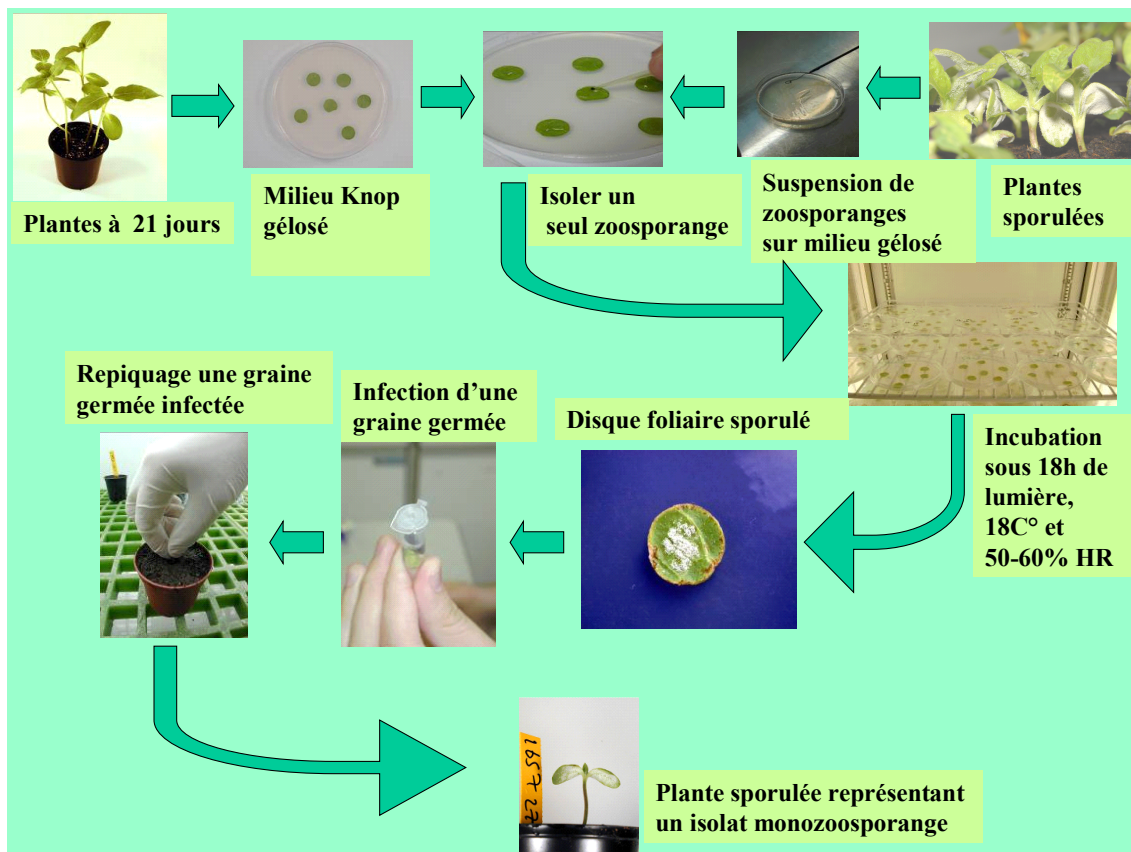


Figure 7 : Protocole d'obtention des isolats monozoosporanges chez *Plasmopara halstedii*.

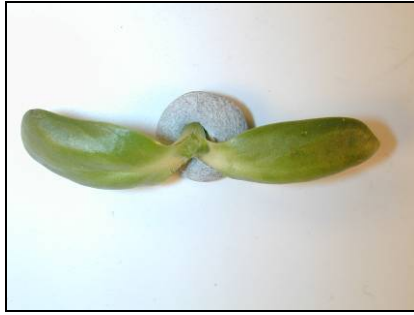


Figure 8 : Stade de lecture des symptômes sur cotylédons : pas de sporulation (gauche), présence de sporulation (droite).

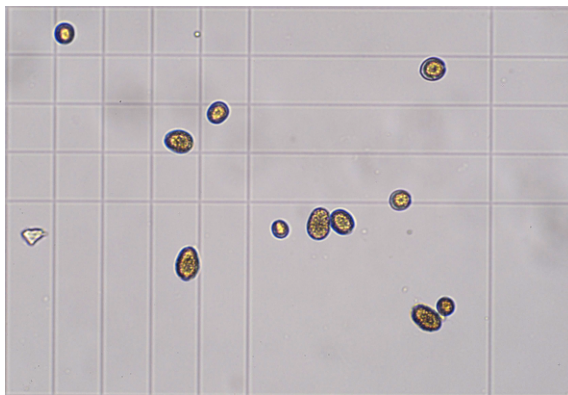


Figure 9 : Zoosporanges de *Plasmopara halstedii* sur la cellule de Malassez.



Figure 10 : Longueur de l'hypocotyle de génotype « FU » sans infection (gauche), diverses tailles d'hypocotyles obtenus après l'infection sur le même génotype (droite).

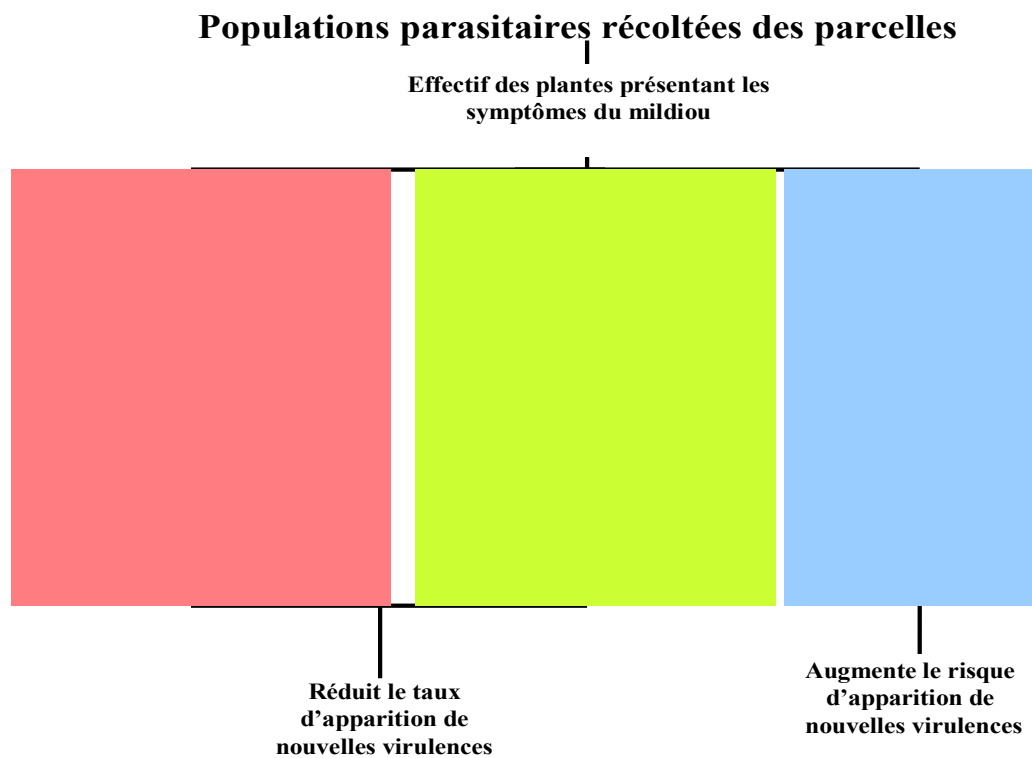


Figure 11 : Variabilité d'agressivité et apparition de nouvelles virulences dans des populations multipliées sous différentes stratégies de gestion de gènes *Pl*.

INTRODUCTION

Plasmopara halstedii, agent responsable du mildiou du tournesol, est un Oomycète (stramenopiles), parasite obligatoire, qui se caractérise par la présence de races (pathotypes) capables d'infecter un nombre plus ou moins important de génotypes de tournesol. La classification de ces pathotypes est basée sur le comportement d'une série de lignées différentielles (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). La présence de nombreuses races de *P. halstedii* a été démontrée par Gulya (2007) qui en dénombre 35 réparties sur les différents continents.

Chez le tournesol cultivé, la résistance au mildiou est de type vertical (Bouzidi *et al.*, 2002). Elle est gouvernée par des gènes de type dominant appelés *Pl* (Vranceanu et Stoenescu, 1970). L'utilisation de génotypes possédant des gènes de résistance est une façon efficace de lutter contre le développement de la maladie. Cependant, malgré tous les efforts des sélectionneurs, le mildiou reste une menace pour la culture du tournesol en France.

L'apparition, à la fin des années 80 (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 1988), de nouveaux pathotypes a modifié la capacité d'évolution des populations parasitaires. En effet, les populations actuelles paraissent, aujourd'hui, douées d'une aptitude au changement considérable. Nous sommes passés de 3 pathotypes en 1990 (races 100, 710 et 703), à 5 en 1995 (races 300 et 700), 7 en 2001 (races 304 et 314) et pas moins de 13 (races 304, 307, 334, 704, 707 et 717) en 2004 et les 8 races découvertes depuis 2000 n'ont jamais été décrites ailleurs et semblent bien être issues d'une évolution *intra muros* du parasite. Cette évolution semble liée à l'utilisation quasi exclusive d'un gène (*Pl6*), qui a été surmonté par le parasite. L'utilisation plus tardive d'un autre gène (*Pl5*) a conduit en 2004 à l'apparition d'une nouvelle virulence (Tourvieille de Labrouhe, 2004). La « **durée de vie** » d'un gène *Pl* apparaît très courte à partir du moment où il est utilisé seul sur une sole importante.

Cela pose le problème de la durabilité des gènes de résistance *Pl*. L'évolution de la population parasitaire dépend de la potentialité évolutive des populations de pathogène (McDonald et Linde, 2002). Les mêmes auteurs ont mis en évidence que la pression de sélection appliquée par la résistance de l'hôte jouerait un rôle important dans la dynamique des populations parasitaires en favorisant l'apparition et la multiplication des individus les mieux adaptés à l'hôte. Cette adaptation à l'hôte est mesurable sur la composante qualitative du pouvoir pathogène : la virulence et sur sa composante quantitative : l'agressivité.

Dans le cas du pathosystème *P. halstedii* / *H. annuus*, la variabilité de l'agressivité en fonction de différents profils de virulence n'a pas été étudiée à ce jour. L'absence de recherche sur l'agressivité du mildiou du tournesol s'explique par la présence de nombreux profils de virulence identifiés, qui a conduit les généticiens à rechercher de nouveaux gènes de résistance complète pour assurer la présence sur le marché de variétés adaptées au risque mildiou.

Tourvieille de Labrouhe *et al.*, (2005) ont montré que les méthodes de gestion de gènes *Pl* conduisent diversement à l'apparition de nouvelles virulences. Alors que, une adaptation plus ou moins rapide du pathogène conditionne la durabilité des méthodes de lutte génétique qui sont mises en œuvre, le passage de l'état avirulent à l'état virulent d'une souche donnée de *P. halstedii* par rapport à un gène donné *Pl* peut être associé à des changements de l'agressivité. C'est l'hypothèse du **coût de la virulence** tel qu'il est défini par Rapilly (1991).

Pour ce pathogène, l'évolution de la virulence est assez bien connue (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005). Par contre, peu de recherche ont été effectuées sur l'agressivité. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la variabilité de celle-ci et aux liens qui pourraient exister entre virulence et agressivité d'une part et entre les modes de gestion des résistances monogéniques et l'évolution de l'agressivité d'autre part. À partir de ces études, des hypothèses théoriques pouvant expliquer la **durabilité de la résistance monogénique** seront présentées afin de comprendre les processus évolutifs associés à l'adaptation de *P. halstedii* en présence des nouveaux gènes *Pl*.

Nos résultats pourraient intéresser les sélectionneurs afin de mettre en œuvre une stratégie globale de lutte contre le pathogène.

OBJECTIFS DE THÈSE

La durabilité des résistances du tournesol vis-à-vis de *Plasmopara halstedii* (c'est-à-dire le temps qui s'écoule entre l'utilisation des gènes *Pl* en culture et leur perte d'efficacité) compte parmi les sujets de recherche les plus importants dans les programmes d'amélioration de cette espèce. La virulence est la composante qualitative du pouvoir pathogène, l'agressivité est la composante quantitative. Dans les processus de coévolution *P. halstedii* / *H. annuus*, les deux composantes jouent un rôle déterminant dans l'adaptation du champignon à un environnement donné.

La durabilité de la résistance est liée principalement à la capacité du champignon à évoluer, soit en développement de nouveaux gènes de virulence capables de surmonter les gènes de la résistance verticale, soit en déployant des populations plus agressives. Il a été montré que la pression de sélection exercée par les gènes *Pl* sur les populations du pathogène, est responsable de l'émergence de nouvelles virulences (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005).

La durabilité des gènes *Pl* de résistance dépend de l'apparition des nouvelles virulences dont la vitesse d'implantation dépend d'autres caractères liés à la « fitness » du parasite telle que l'agressivité. La connaissance des liens qui pourraient exister entre la virulence et l'agressivité, apporterait des informations très utiles pour prédire la durée de vie d'un gène *Pl*. Ces liens peuvent être négatifs, c'est-à-dire que l'apparition d'une nouvelle virulence est associée à une perte d'agressivité. On parle alors de coût de la virulence (Rapilly, 1991) qui est d'autant plus élevé pour un pathotype qu'il possède des virulences inutiles par rapport à la plante hôte.

Le premier objectif de la thèse est de mettre en évidence les conséquences de l'apparition de nouvelles virulences sur l'agressivité du parasite. Les composantes de l'agressivité mesurées chez un génotype de tournesol sans gène *Pl*, comme la durée de la période de latence, le nombre de spores émises par les organes infestés et le dérèglement dans la production d'hormone de croissance provoquant un nanisme chez la plante malade, sont-elles modifiées par l'apparition d'une ou de plusieurs nouvelles virulences ? Cette relation pourra expliquer la vitesse d'évolution des races qui est actuellement observée en culture.

Le deuxième objectif de la thèse est de mettre en évidence l'impact de trois méthodes de gestion des gènes majeurs de la résistance *Pl* : la monoculture de génotypes ne possédant qu'un seul gène de résistance efficace, l'alternance et l'assemblage ou pyramidage sur les caractères quantitatifs du pouvoir pathogène. La pression exercée par les gènes *Pl* conduit rapidement à l'apparition de nouveaux pathotypes mais qu'en est-il des autres facteurs intervenant dans le pouvoir pathogène ? Pour répondre à cette question nous comparerons l'évolution des caractères liés à l'agressivité au sein des populations parasitaires appartenant au même pathotype et qui ont subi 4 années de pressions variétales différentes. Un éventuel effet sur l'agressivité, indépendamment de l'apparition de nouvelles virulences, pourrait remettre en cause l'intérêt de telle ou telle méthode de gestion des gènes *Pl*.

Enfin, la réflexion sur la durabilité de la résistance race spécifique sera élargie à la résistance partielle non-race spécifique. En effet, l'intérêt de sélectionner pour ce type de résistance dépend de la capacité de *P. halstedii* à évoluer vers plus d'agressivité.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Les maladies des plantes occasionnent encore des pertes économiques importantes. Il est impératif de protéger les cultures contre l'attaque des agents pathogènes. L'industrie chimique a apporté des solutions rapides et efficaces par la synthèse de pesticides mais leurs effets nocifs sur l'environnement et la santé tendent à limiter leur emploi. Actuellement, les moyens de protection des cultures privilégiant les ressources naturelles comme l'utilisation de variétés résistantes aux parasites, est un moyen de limiter l'utilisation des pesticides. Cependant, les agents pathogènes peuvent se révéler capables de contourner les résistances introduites dans ces variétés. Cette durabilité des résistances varie en fonction de nombreux paramètres. La plante hôte et le parasite coévoluent en utilisant au mieux leur capacité à s'adapter à l'environnement. L'évolution des populations d'agents pathogènes entraîne fréquemment après quelques années de culture, l'inefficacité des résistances introduites car les pathogènes neutralisent l'effet des gènes de résistance par une mutation dans l'allèle d'avirulence (Leach *et al.*, 2001 ; McDonald et Linde, 2002 ; Parlevliet, 2002).

Les plantes sont soumises à différentes sortes de microorganismes pathogènes comme des virus, des bactéries des champignons mais également à des nématodes ou des insectes. Tous ces pathogènes possèdent en commun la capacité de co-évoluer avec leur plante-hôte de manière à contourner leurs gènes de résistance. Les exemples de coévolution sont nombreux (Schouten et Beniers, 1997 ; Kover et Schaal, 2002 ; Sacristan *et al.*, 2005 ; Henry *et al.*, 2008). Au cours de notre étude bibliographique, seuls les champignons phytopathogènes seront étudiés.

I – Le pouvoir pathogène chez les champignons pathogènes des plantes

I – 1 – Définitions

Le pouvoir pathogène est un terme général qui inclut deux composantes : une composante **quantitative** appelée « **agressivité** » (capacité non spécifique à produire la maladie) et une composante **qualitative** appelée « **virulence** » (capacité spécifique à produire la maladie) selon Van der Plank (1968).

L'évolution de la population d'un agent pathogène ou « **fitness** » peut être définie comme la capacité que possède une souche à se reproduire, se multiplier et survivre comparativement à d'autres souches du même agent pathogène et dans les mêmes conditions, c'est-à-dire la faculté à

se maintenir d'une génération à l'autre (Crow, 1986 ; Pringle et Taylor, 2002). La capacité d'un pathogène à se maintenir en dehors de son hôte, par exemple durant les phases de repos végétatif, est également un élément de la « fitness ».

La « fitness » peut aussi être définie comme la capacité d'un individu à contribuer au prochain pool génétique, c'est-à-dire à la génération suivante (Antonovics et Alexander, 1989).

Dans notre travail, la « fitness » est définie comme **l'aptitude d'un parasite à s'adapter à un environnement donné**, qui dépend, entre autres, de son pouvoir pathogène.

Ainsi, Fry *et al.*, (1993) ont remarqué qu'une « fitness » élevée était associée à une agressivité élevée. Le « coût » sur la « fitness » associé à l'évolution du pathogène d'avirulent à virulent pour contourner la résistance de l'hôte, affecte la durabilité de la résistance (Cruz *et al.*, 2000 ; Leach *et al.*, 2001). Chez les pathogènes de plantes, plusieurs paramètres comme la fréquence et l'efficacité de l'infection, la densité de sporulation, l'intensité des dégâts causés, peuvent être utilisés pour mesurer la « fitness » (Day et Shattock, 1997 ; Cruz *et al.*, 2000 ; Leach *et al.*, 2001 ; Pringle et Taylor, 2002).

I – 1 – 1 – L'agressivité

L'agressivité, composante quantitative du pouvoir pathogène, ne s'exprime que si le parasite est virulent (Rapilly, 1991). Elle est gouvernée par plusieurs gènes dont les effets se cumulent. Robinson (1976) a signalé que la résistance horizontale de l'hôte et l'agressivité du pathogène sont indépendants. Son expression est souvent influencée par les facteurs physiques du climat.

L'agressivité d'un pathogène peut être définie comme la capacité globale de ce pathogène à attaquer sa plante hôte (Cooke et Deahl, 1998). Si deux races virulentes d'un agent pathogène induisent des niveaux de gravité de maladie différents sur une même plante hôte, ces deux races diffèrent par leur agressivité. Carlisle *et al.*, (2002) ont comparé l'agressivité de vingt isolats de *Phytophthora infestans* après leur inoculation sur des feuilles détachées de trois cultivars de pomme de terre choisis en fonction de leur niveau de résistance non-race spécifique. Ils ont observé beaucoup de variabilité pour les quatre paramètres de l'agressivité mesurés (période de latence, fréquence d'infection, la surface relative sous la courbe d'expansion des lésions et densité de sporulation). Les différences étaient plus importantes sur les cultivars de pomme de terre qui présentaient une résistance non-race spécifique importante. Les paramètres étudiés étaient fortement corrélés entre eux.

Rimé *et al.*, (2005) ont montré qu'une bonne connaissance des composantes de l'agressivité (taille des lésions, production de spores, etc.) d'un pathogène en relation avec le génotype de l'hôte aiderait à définir les paramètres les plus pertinents pour la mesure de cette agressivité. La mesure des surfaces présentant des spores sur des feuilles de différents cultivars de blé (*Triticum*

aestivum) paraît être un meilleur paramètre pour quantifier l'agressivité de *P. triticina* que le nombre de lésions

L'accroissement de la « fitness » d'un parasite, due à une augmentation de son agressivité, est rapidement contrebalancé par une réduction de son pouvoir de dissémination, liée à la disparition des tissus qui servent de support à la multiplication du parasite et à la production d'inoculum. De ce fait, et particulièrement pour un parasite biotrophe, il apparaît un seuil d'agressivité favorable au parasite. Cependant, ce seuil dépend de techniques culturales qui peuvent assurer l'éloignement des cultures sensibles ou l'hétérogénéité de l'hôte tels que les mélanges variétaux (Villareal et Lannou, 2000 ; De Vallavieille-Pope, 2004).

I – 1 – 2 – La virulence

La virulence est la composante qualitative du pouvoir pathogène permettant à un pathogène d'infecter un hôte donné (Rapilly, 1991). Elle est souvent de type « tout ou rien » et dépend de gènes isolés et indépendants. Elle est généralement portée, chez les champignons par des gènes récessifs. C'est le système « **gène pour gène** » décrit par Flor (1971). La virulence est définie comme la capacité d'un pathogène à éviter la reconnaissance induite par un gène de résistance donné et à induire la maladie (Gout *et al.*, 2007). Lors d'une interaction de type "gène pour gène", les produits des allèles *Avr* des gènes d'avirulence, aussi dénommés éliciteurs races spécifiques, sont reconnus par les produits des allèles *R* des gènes de résistance, qui sont eux, des récepteurs (Gabriel, 1999). L'interaction entre les produits de ces gènes permet d'initier rapidement une cascade de signaux déclenchant les systèmes de défense de la plante : production de substances nocives au pathogène (phytoalexines, enzymes lytiques telles que chitinases, glucanases, ...) ou enrayant sa propagation (lignine, callose, ...) ; la plante résiste : la relation est dite incompatible. Dans toutes les situations où à un allèle *Avr* du pathogène ne correspond pas un allèle *R* de la plante, l'induction des mécanismes de défense de la plante est retardée, incomplète ou insuffisante et l'agent pathogène envahit la plante : la relation est dite alors compatible et la plante est sensible (Tableau 1).

Les facteurs d'avirulence, codés par les gènes de virulence des champignons pathogènes, déterminent la capacité des plantes hôtes à les reconnaître de manière « race spécifique » par l'intermédiaire des protéines de résistance, codées par leurs gènes de résistance. Ces protéines de résistance reconnaissent les facteurs d'avirulence des pathogènes comme des signaux d'invasion, elles activent rapidement une suite de mécanismes de défense qui peut conduire à la mort cellulaire. Pour être efficaces, ces protéines doivent reconnaître un ou plusieurs facteurs de virulence. Elles peuvent être inactivées par le pathogène lui-même qui altère ou détruit le facteur

de résistance et contourne ainsi la résistance (Rep, 2005 ; Chisholm *et al.*, 2006 ; Ridout *et al.*, 2006).

La plupart des gènes spécifiques de la résistance, code pour des protéines de type NBS-LRR qui interagissent avec des facteurs de l'agent pathogène et/ou de la plante (de Young et Innes, 2006 ; McDowell et Simon, 2006). Ces protéines, issues de ces gènes, possèdent un domaine répété riche en leucine (LRR), les intracellulaires possèdent des domaines de fixation de nucléotides (NBS).

L'étude d'une relation éventuelle entre la virulence et l'agressivité pourra nous aider à comprendre la dynamique des populations parasites (Leach *et al.*, 2001 ; McDonald et Linde, 2002). La virulence peut être considérée comme une force évolutive qui permet au pathogène de surmonter les nouveaux gènes de résistance qualitative utilisés dans les zones de culture et l'agressivité représente l'avantage donné au pathogène pour se développer dans sa plante hôte (Van der Plank, 1968 ; Robinson, 1976). Robinson (1976) a signalé que la virulence = « pathogénicité verticale » et l'agressivité = « pathogénicité horizontale » sont corrélées négativement comme dans les couples des champignons *Cochliobolus heterostrophus* / maïs (Carson, 1998), *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* / tabac (Sullivan *et al.*, 2005a), *Leptosphaeria maculans* / colza (Huang *et al.*, 2006) et *Magnaporthe oryzae* / blé et millet (Murakami *et al.*, 2006). Cependant, les deux composantes du pouvoir pathogène peuvent être corrélées positivement comme dans les couples des champignons *Albugo candida* / colza (Fox et Williams, 1984), *Phytophthora infestans* / pomme de terre (Miller *et al.*, 1998), *Botrytis cinerea* / vigne (Derckel *et al.*, 1999), *Cryphonectria parasitica* / châtaignier (Peever *et al.*, 2000), *Phakospora pachyrhizi* et *P. meibomiae* / soja (Bonde *et al.*, 2006).

I – 2 – Coût de la virulence superflue

Certains pathogènes hôtes spécifiques, montrent une relation étroite avec leurs hôtes respectifs. On peut s'attendre à une coévolution de type « gène-pour-gène ». Dans une telle interaction, une nouvelle résistance chez l'hôte est surmontée par un changement de virulence du pathogène (Drenth et Goodwin, 1999 ; McDonald et Linde, 2002). Au cours de l'évolution, certains gènes de la virulence deviennent inutiles soit parce que les gènes de résistance correspondants sont portés par des cultivars qui ne sont plus utilisés, soit parce que ces gènes de virulence n'ont jamais été utilisés (Munk *et al.*, 1991). Dans ce dernier cas les gènes sont dits « universellement » superflus. La plupart des modèles de coévolution hôte-parasite assument un coût de la « fitness » pour la virulence devenue superflue (Leach *et al.*, 2001). La modification de la fonction biologique de ce gène d'avirulence lors de la mutation vers l'état virulent est associée à une augmentation de la « fitness » du pathogène si les gènes de résistance sont

présents chez l'hôte, mais à une perte de « fitness » si ces gènes sont absents : c'est l'hypothèse du **coût de la virulence** selon Van der Plank (1968).

Plusieurs auteurs ont essayé de mesurer l'impact de la « virulence superflue » sur la réduction de la « fitness » du pathogène. Les valeurs mesurées de cet effet varient pour les isolats de *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* sur avoine de 14 à 39 % (Leonard, 1969), de 12 à 30 % pour *Bipolaris maydis* sur maïs (Leonard, 1977), de 4 à 5,2 % pour *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* sur blé (Grant et Archer, 1983) et de 5,4 à 6,1 % pour *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* sur orge (Grant et Archer, 1983). Ces différents auteurs ont montré que les résultats varient en fonction du pathogène et la plante hôte. Cependant, dans d'autres études, aucune relation n'est trouvée entre la « fitness » et le nombre de gènes de virulence portés par le pathogène, par exemple chez *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* (Bronson et Ellingboe, 1986) et *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* (Kolmer, 1993). Au contraire du postulat proposé par Van der Plank (1968), Leonard (2007) a montré que, chez *Puccinia coronata*, certaines associations de virulence retrouvées à plusieurs reprises au cours des années indiquent que certaines paires de gènes de virulence contribuent à augmenter la « fitness » lorsqu'ils se retrouvent ensemble, souvent en l'absence des gènes de résistance correspondants chez l'avoine.

La « charge génétique » peut être définie comme le coût génétique qui correspond à l'éloignement d'un pathotype avec sa forme la plus simple et la plus adaptée pour attaquer un pathodème donné. Le « **coût de la virulence** » est **d'autant plus élevé pour un pathotype qu'il possède des virulences inutiles par rapport à une population hôte ayant un profil de résistance spécifique**. Une charge en gènes superflus élevée est a priori néfaste au parasite selon Rapilly, (1991).

I – 3 – Moyens d'étude de l'agressivité chez les champignons pathogènes

De nombreux couples hôte/pathogène ont fait l'objet d'études visant à quantifier l'agressivité du pathogène. Les moyens mis en œuvre pour mesurer cette agressivité diffèrent suivant les auteurs. La durée de latence d'apparition des symptômes, l'importance de ceux-ci, la densité de sporulation sont les critères le plus souvent retenus.

I – 3 – 1 – Le pathosystème *Phytophthora infestans* / *Solanum tuberosum*

Le couple *P. infestans* / *Solanum tuberosum* (mildiou de la pomme de terre) est un des pathosystèmes les plus étudiés pour mesurer la diversité du pouvoir pathogène d'un Oomycète. Miller *et al.*, (1998) ont comparé des isolats d'une ancienne population de *P. infestans* : US-1 avec des isolats des populations récentes : US-8 et US-11. L'agressivité élevée a été caractérisée

par une surface relative élevée sous la courbe d'expansion des lésions, une sporulation importante et une période de latence courte. La durée d'incubation apparaît peu discriminante puisque peu de différences significatives sont détectées entre les isolats. La période de latence et la densité de sporulation sont plus pertinentes pour évaluer l'agressivité. Ils ont montré que la relation est positive entre les deux composantes du pouvoir pathogène : les nouvelles populations sont plus virulentes et plus agressives que les anciennes. De plus, Flier et Turkensteen (1999) ont suggéré que des variations importantes de l'agressivité chez d'anciennes et nouvelles populations d'isolats hollandais de *P. infestans* pourraient s'expliquer par la fréquence de la reproduction sexuée chez ce pathogène qui augmente la fréquence des recombinaisons génétiques.

Suassuna *et al.*, (2004) ont comparé l'agressivité de deux isolats de *P. infestans* présents au Brésil : US-1 associé aux plants de tomates et BR-1 associé aux plants de pomme de terre. En parallèle aux infections avec les hôtes respectifs, ils ont réalisé des infections croisées : US-1 avec des plants de pomme de terre et BR-1 avec des plants de tomate. Les croisements avec l'hôte d'origine conduisent aux dommages les plus importants. Pour eux, les différences mesurées au niveau des composantes de l'agressivité (fréquence d'infection, période d'incubation, période de latence, surface de nécrose, etc.) entre les isolats US-1 et BR-1 contribuent à expliquer la spécificité d'hôtes de *P. infestans*. Le pathogène serait programmé pour attaquer plus spécifiquement le type d'hôtes chez laquelle il a été isolé.

Chacon *et al.*, (2007) utilisent six composantes épidémiologiques pour mesurer l'agressivité de quatre isolats de *P. infestans* isolés à partir d'espèces cultivées et sauvages de pomme de terre : la fréquence d'infection, la période d'incubation, la période de latence, la taille des lésions, le pourcentage de lésions et la surface relative sous la courbe d'expansion des lésions. Ils ont montré que ces critères de l'agressivité peuvent être utilisés pour différencier les souches entre elles. Leurs résultats confirment que l'agressivité des souches de *P. infestans* peut changer en fonction de l'origine du pathogène et des plantes hôtes.

I – 3 – 2 – Le pathosystème *Bremia lactucae* / *Lactuca spp*

L'une des principales maladies de la laitue (le mildiou) est causée par *B. lactucae*. L'interaction *Bremia*-laitue est de type gène-pour-gène. Des changements importants dans la fréquence des gènes de résistance (*Dm* et *R*) sont liés à l'apparition de nouveaux isolats virulents. L'utilisation de résistances monogéniques à grande échelle crée une pression de sélection sur *B. lactucae*. Des isolats capables de surmonter ces résistances apparaissent. La recherche de nouvelles sources de résistance peut se faire en prospectant chez d'anciens cultivars ou en construisant des génotypes résistants à partir d'associations de facteurs de résistance déjà existants (Baudhuin, 2004). L'utilisation de variétés multilignées pourrait offrir une pression de sélection moins forte au

champignon et ainsi freiner son évolution. Les dates d'apparition du mildiou et les notations sur l'évolution de la maladie au niveau des feuilles (sporulation) sont utilisées pour quantifier la maladie (Baudhuin, 2004).

Hooftman *et al.*, (2007) pour comparer l'effet de 2 souches de *B. lactucae*, responsables du mildiou de la laitue (*Lactuca serriola*), proposent les mesures quantitatives basées soit sur une note de 0 à 3 selon l'importance des symptômes observés sur feuille, soit sur la quantification de l'invasion des tissus en comptant après coloration, la densité des haustoria formés par le parasite ou encore en prenant en compte des caractéristiques agronomiques (quantité et poids de semence).

I – 3 – 3 – Le pathosystème *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* / *Triticum aestivum*

P. graminis forme cinq types de spores différents. Les urédiniospores infectent et propagent la rouille sur le blé. Les lésions causées sont facilement mesurées. Les urédiniospores peuvent être comptées. Les résultats obtenus par Newton *et al.*, (1999) démontrent que les souches de *P. graminis* f.sp. *tritici* ajustent leur production de spores en fonction de la compétition entre les différents pathotypes présents dans leur environnement. La période de latence précédant la production de spores est minimisée quand la compétition est importante, ce qui assure un avantage certain aux souches capables d'assurer cette évolution.

I – 3 – 4 – le pathosystème *Alternaria brassicicola* / *Cakile maritima*

Des variations dans l'agressivité de différents isolats d'*A. brassicicola* ont été mises en évidence par Thrall *et al.*, (2005) sur *Cakile maritima*. Ces auteurs ont mesuré la vitesse de croissance du mycélium des isolats sur un milieu artificiel. Des différences sont observées aussi bien au niveau de la population du pathogène dans son ensemble qu'au niveau des isolats pris individuellement. Une corrélation existe entre la vitesse de croissance et la production de spores sur le milieu artificiel. Plus le pathogène se développe vite, moins de spores sont produites par unité de surface. Il existe peu de preuve entre la croissance sur un milieu artificiel et la sévérité des symptômes sur les plantes. Les auteurs suggèrent que des variations dans l'agressivité pourraient influencer dans la nature, la dynamique des maladies. De même ils émettent l'hypothèse que la balance entre la vitesse de croissance et la sporulation permettrait de maintenir une variabilité importante du pathogène, un facteur compensant l'autre.

Ces exemples montrent que les mesures réalisées pour quantifier l'agressivité peuvent être différentes selon le pathosystème : parasite obligatoire ou facultatif. Par exemple, pour *A. brassicicola* qui est un parasite facultatif, la croissance et le développement du mycélium de champignon sur un milieu artificiel peuvent être utilisées pour mesurer l'agressivité. Pour un

parasite obligatoire comme *B. lactucae*, il est nécessaire de quantifier la sévérité des symptômes comme la durée de latence avant leur apparition sur les plantes hôtes et la densité de sporulation, afin d'estimer l'agressivité de ce pathogène. Cependant, pour un parasite comme *P. infestans*, intermédiaire entre les parasites obligatoires et facultatifs, les critères de développement du champignon sur un milieu artificiel et la notation de la sévérité des symptômes sur les plantes hôtes peuvent être employés pour quantifier l'agressivité. La deuxième approche est cependant largement utilisée dans les études bibliographiques.

I – 4 – Relations entre l'agressivité et la pression de sélection exercée par les gènes de résistance de la plante-hôte

Les individus fongiques sélectionnés par les hôtes résistants posséderaient un ou plusieurs caractères qui leur donneraient un avantage génétique. L'agressivité d'un pathogène serait modifiée par plusieurs gènes à effet additif de la plante-hôte, correspondant de la résistance horizontale. Dans le pathosystème *C. heterostrophus* / maïs, Kolmer et Leonard (1986) ont montré que l'agressivité exprimée par la taille des taches a augmenté de 18 % après la multiplication du champignon sur un génotype « 316 » porteur d'un niveau de résistance horizontale élevé pendant 3 cycles alors que, l'agressivité varie de 7 à 10 % lorsque la pression de sélection est exercée par 3 génotypes porteurs d'une résistance horizontale, différente de celle du génotype « 316 ». Ils ont signalé qu'il existe un effet spécifique du cultivar sur l'agressivité. Gould *et al.*, (1991) ont montré que l'agressivité évolue lentement en présence d'hôtes partiellement résistants. Les niveaux faibles de la résistance quantitative (non-race spécifique) de l'hôte sélectionnent des niveaux élevés d'agressivité (mesurée par l'importance des symptômes sur les génotypes de l'hôte avec résistance quantitative), tandis que la résistance qualitative (race spécifique) n'exercerait pas un effet sélectif semblable dans le couple *P. parasitica* var. *nicotianae* / tabac (Sullivan *et al.*, 2005b). Ces résultats sont en accord avec ceux qui sont obtenus par Flier *et al.*, (2007) dans le pathosystème *P. infestans* / pomme de terre. Ils ont mis en évidence que l'introduction des cultivars porteurs d'une résistance race spécifique dans les régions de culture de la pomme de terre ne sélectionnait pas des niveaux élevés de l'agressivité chez le pathogène.

Cowger et Mundt (2002) ont montré que les cultivars de blé (*Triticum aestivum*) présentant une résistance partielle élevée sélectionnent les isolats les plus agressifs de *Mycosphaerella graminicola*. Gandon et Michalakakis (2000) suggèrent que les hôtes, présentant une résistance partielle, favorisent la sélection des souches de pathogènes plus agressives conduisant de cette façon à rompre la résistance, s'ils sont utilisés en monoculture.

La faculté d'une pression de sélection donnée, à modifier l'agressivité d'un parasite, re-présente un sujet important dans la compréhension des interactions plante-parasite. Dans ces exemples, les résistances partielles portées par les plantes hôtes exercent sur les populations parasitaires des pressions de sélection qui peuvent augmenter, diminuer ou ne pas modifier la composante quantitative du pouvoir pathogène. Si on considère que l'agressivité et la résistance non-race spécifique sont indépendantes, l'étude des modifications de l'agressivité, qui est une des composantes du pouvoir pathogène, pourra nous aider à mettre en place des stratégies de résistance durable contre les pathogènes.

I – 5 – Relations entre l'agressivité et les conditions environnementales

Les facteurs édaphiques interviennent dans le maintien de l'agressivité des pathogènes.

I – 5 – 1 – L'hivernage des pathogènes

Sullivan *et al.*, (2005a) ont trouvé que les isolats de la race 0 du *P. parasitica* var. *nicotianae* étaient plus agressifs que des isolats de la race 1, sur des cultivars de tabac présentant des niveaux modérés ou élevés de résistance partielle. Les périodes de latence étaient plus courtes et le niveau de pourriture des racines était plus grand que pour les isolats de la race 1. Mais, ils ont observé que les populations de la race 0 déclinent plus rapidement que celles de la race 1 durant l'hiver. La capacité des isolats du *P. parasitica* var. *nicotianae* à hiverner a été négativement corrélée avec leur agressivité.

Les travaux de Montarry *et al.*, (2007) ont montré que les taux de survie hivernale de tubercules de pomme de terre infectés avec des isolats de *P. infestans* présentant divers degrés d'agressivité, ne différaient pas significativement en fonction de l'isolat. Ces résultats suggèrent que l'agressivité qui augmente progressivement dans les populations de *P. infestans* dans les phases parasitaires pourrait ne pas se maintenir dans les phases de conservation du fait de la réduction importante des réserves nutritives.

Ces exemples montrent que plus d'agressivité peut être liée à une moindre vigueur pendant les phases non parasitaires, or ces deux facteurs participent à la « fitness ».

I – 5 – 2 – Le stress hydrique

Chez *Sphaeropsis sapinea*, il existe deux morphotypes distincts (A et B). Ils diffèrent par : la morphologie des colonies, les taux de croissance sur milieux PDA et les tailles moyennes des spores (Swart et Wingfield, 1991). Les isolats du morphotype A sont plus agressifs sur le pin rouge que les isolats du morphotype B (Blodgett et Stanosz, 1997). La sévérité des symptômes est exprimée par la présence des taches nécrotiques et du chancre, la couleur des blessures et le

flux de résine produit par la blessure 4 semaines après l'inoculation. Par des travaux d'inoculation artificielle en serre et en chambre de culture, Blodgett *et al.*, (1997) ont trouvé qu'un stress hydrique appliqué sur des plantules de pin rouge favorise le développement de la maladie et la colonisation par des isolats du morphotype A. Il induit un flux de résine réduit au niveau de la blessure. Il inhiberait la réponse défensive. Les isolats du morphotype B n'ont montré aucune augmentation significative d'agressivité quand leurs hôtes étaient soumis à un stress hydrique.

L'influence du stress hydrique sur l'agressivité semble spécifique. En effet, le niveau de production des symptômes augmente lorsque les souches les plus agressives sont soumises à un stress donné. Cependant, un stress de même intensité ne modifie pas le niveau des symptômes pour les souches les moins agressives.

I – 6 – Relations entre l'agressivité et la sensibilité aux fongicides

La maîtrise des épidémies nécessite souvent l'utilisation de nombreux traitements phytosanitaires. Ceux-ci exercent une pression de sélection sur les populations d'agents pathogènes et favorisent l'émergence de souches résistantes aux molécules chimiques (Baraldi *et al.*, 2003 ; Ziogas *et al.*, 2003). La résistance d'un pathogène donné aux fongicides, peut augmenter sa « fitness » car elle lui permet de mieux s'adapter à son environnement. L'adaptation à un fongicide est très variable pour une espèce donnée et dépend également de la famille chimique du fongicide. Un temps de génération court, une abondante sporulation facilement dispersée, et l'isolement du pathogène tendent à augmenter le risque de résistance aux fongicides. La résistance à un fongicide est le reflet de mutations dans le génome du pathogène. Grinberger *et al.*, (1995) ont noté que les isolats de *P. infestans* résistants au metalaxyl produisent des lésions sensiblement plus grandes et plus profondes sur des tubercules de pomme de terre que des isolats sensibles au metalaxyl.

Day et Shattock (1997) ont observé que des phénotypes de *P. infestans* sensibles au métalaxyl étaient généralement plus agressifs que les isolats résistants, sur deux cultivars Cara et Stirling de pomme de terre possédant des niveaux de résistance non-race spécifique élevés, mais pas sur les cultivars les plus sensibles comme Maris Piper.

Raposo *et al.*, (1996) ont démontré qu'il n'existait pas de différences d'agressivité associée à la résistance à l'iprodione (dicarboximide) et au benomyl (benzimidazole) chez *Botrytis cinerea*. Ces différences ont été évaluées *in vivo* en mesurant le taux de sporulation et la taille des lésions sur des disques de feuilles.

Dans le pathosystème *Pythium aphanidermatum* / tomate, Al-Saadi *et al.*, (2003) n'ont pas trouvé de corrélation entre l'agressivité et la sensibilité au metalaxyl.

Lebreton *et al.*, (2004) ont comparé à l'aide de marqueurs moléculaires de type AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) des populations de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (agent du piétin-échaudage) échantillonnées dans des monocultures de blé ayant ou non subi des traitements fongicides. Ils ont démontré que l'évolution des populations de pathogène est davantage liée à la pression de sélection exercée par les cultures successives de blé que par les traitements fongicides répétés.

I – 7 – Relations entre l'agressivité et la diversité génétique

Iriarte *et al.*, (2004) ont comparé l'agressivité des isolats d'*Ophiosphaerella korrae* aux groupes obtenus en AFLP. Les souches les plus agressives provoquent des taches plus grandes que des souches moins agressives sur des cultivars du gazon des Bermudes dans les conditions de serre. Les isolats représentant des groupes II et III AFLP se sont développés plus rapidement sur PDA à 25°C et 30°C que des isolats du groupe I. Cependant l'agressivité des isolats d'*O. korrae* n'est pas associée aux groupes AFLP.

Smith et Stanosz (1995) ont trouvé que les souches de morphotype A et morphotype B de *Sphaeropsis sapinea* sont séparées dans deux groupes caractérisés par analyses RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Selon Harrington *et al.*, (2003), la pourriture brune de la tige de soja est provoquée par l'une des deux formes de *Phialophora gregata*, le génotype A étant le plus agressif et le génotype M, le moins agressif. Dans les expériences en chambre de culture, les isolats du génotype A ont causé les plus grands symptômes foliaires et une décoloration vasculaire plus importante que les isolats des génotypes M sur les deux cultivars (R et S) de soja. Sept génotypes (A1, A2, A4, A5, A6, M1 et M2) étaient différenciés sur la base de leur profil obtenu avec les sondes microsatellites (CAT)₅ et (CAC)₅, avec seulement des variations génétiques mineures à l'intérieur des groupes A et M.

Des isolats français de *Phytophthora infestans* caractérisés génétiquement en utilisant des marqueurs AFLP ont été échantillonnés deux années consécutives (2001-2002) sur des variétés de pomme de terre présentant différents niveaux de résistance. Ces populations de pathogène sont structurées par l'hôte pour la virulence mais aussi pour l'agressivité. Aucune corrélation n'a été détectée entre le pouvoir pathogène et le groupe AFLP des différents isolats (Montarry *et al.*, 2006).

L'utilisation de marqueurs moléculaires du génome d'un parasite présente deux intérêts majeurs dans la compréhension de l'évolution de son pouvoir pathogène : i) mettre en évidence un lien entre l'origine (géographique, ...) des souches et les composantes du pouvoir pathogène, ii) identifier les zones du génome qui portent les gènes impliqués dans ce pouvoir pathogène.

En conclusion, les interactions complexes qui existent entre un parasite et sa plante-hôte déterminent la capacité de chacun à se reproduire et à se développer au cours des générations suivantes. En conséquence, l'analyse du pouvoir pathogène incluant la virulence et l'agressivité ne peut pas se faire sans tenir compte des autres mécanismes qui interviennent dans l'adaptation du parasite à son environnement. Tous les facteurs environnementaux influent de façon plus ou moins importante sur un pathosystème donné. Les pathogènes biotrophes sont des cas particuliers car ils dépendent totalement des plantes hôtes pour leurs survies. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à analyser les relations éventuelles entre l'agressivité et les facteurs qui semblent intervenir directement sur le cycle biologique du champignon. Le stress hydrique, la résistance aux fongicides, la présence des phénomènes d'hivernage et la capacité du pathogène à s'adapter aux changements de résistance de sa plante-hôte sont des critères importants pour exprimer son pouvoir pathogène et principalement l'agressivité qui est non spécifique pour un pathogène donné.

II – Les mécanismes de la résistance des plantes

Chez un végétal tout phénomène qui limite le développement d'un parasite est appelé résistance. La résistance des plantes aux pathogènes peut être attribuée à l'action de différents mécanismes qui fonctionnent chacun à un certain niveau et avec une certaine spécificité (Parlevliet, 2002).

Celles qui sont obtenues par amélioration génétique peuvent perdre leur efficacité parfois en quelques années dans le cas de champignons (Leach *et al.*, 2001 ; McDonald et Linde, 2002 ; Parlevliet, 2002). Lorsqu'un agent pathogène donné infecte un nombre restreint d'espèces botaniques, on parle d'espèces hôtes. Au sein de celles-ci, certains génotypes végétaux sont sensibles, le pathogène envahit la plante : la relation est dite compatible. D'autres sont résistants, la plante résiste, la relation est dite incompatible. Parmi les génotypes sensibles, le degré d'attaque de l'agent pathogène peut varier suivant le génotype (Robinson, 1976).

Les pathogènes sont classés en 2 groupes (Parlevliet, 2002) :

1- ceux qui attaquent un nombre limité d'hôtes comme *Puccinia hordei*, pathogène du l'orge,

2- ceux qui sont caractérisés par un nombre élevé d'hôtes comme *Sclerotinia sclerotiorum* et qui affecte plus de 60 familles.

Van der Plank (1963, 1968) a postulé que toutes les résistances aux maladies chez les plantes peuvent être classées dans une des deux catégories suivantes :

- * la résistance verticale (aspect qualitatif de la résistance) monogénique ou oligogénique apportée par un petit nombre de gènes dominants

- * la résistance horizontale (aspect quantitatif de la résistance) polygénique, indépendante des gènes majeurs.

II – 1 – Résistance verticale

Lorsqu'un cultivar est complètement résistant à certaines souches d'un agent pathogène mais sensible à d'autres souches, la résistance est dite 'race spécifique'. Elle permet de distinguer les différentes races d'un agent pathogène. Ces résistances spécifiques sont généralement monogéniques (Robinson, 1976 ; Rappilly, 1991) de type gène pour gène mises en évidence par Flor (1971).

Elle est gouvernée par des gènes majeurs. La réaction d'hypersensibilité qui résulte de la reconnaissance du produit du gène d'avirulence du pathogène par le produit du gène de résistance de la plante, conduit à la mort cellulaire et à la destruction du pathogène (Moerschbacher et Reisener, 1997). D'un point de vue agronomique, la résistance verticale est temporaire et éphémère (Parlevliet, 1993). Elle est facilement contournée par le parasite. Les mutations transformant un pathogène avirulent en un pathogène virulent, conduisent à des changements au niveau de « l'éléciteur » qui n'est plus reconnu par les produits des gènes de résistance et n'induit plus la réaction hypersensible (Parlevliet, 2002). La réaction hypersensible a lieu lorsque le pathogène a traversé la paroi cellulaire et a commencé de former un haustorium ou un hyphé (Niks, 1983 ; Aist et Bushnell, 1991 ; Niks et Dekens, 1991).

Pour l'agent pathogène, le contournement de la résistance peut être facilement obtenu par simple mutation du gène d'avirulence. Les mutations peuvent varier d'une mutation au niveau d'un nucléotide (Joosten *et al.*, 1994) ou provoquer la disparition complète du gène d'avirulence (Joosten et de Wit, 1999). Gout *et al.*, (2007) ont montré que le gain de virulence chez *Leptosphaeria maculans* serait lié à un seul évènement de délétion d'un segment de 260 kb au niveau du gène d'avirulence *AvrLm1*.

Le processus de contournement de la résistance peut être découpé en trois étapes (McDonald et Linde, 2002) :

- * La mutation et/ou la recombinaison au sein du génome du pathogène qui permet l'apparition d'un nouvel individu virulent,

- * La multiplication des variants virulents ; la fréquence des souches mutantes augmente, car elles ne sont plus contrecarrées par le système de défense de l'hôte. Quand la fréquence des

souches mutantes du pathogène atteint au minimum 1%, le gène de résistance est considéré comme ayant perdu son efficacité. On peut parler de « break-down » de la résistance.

* Leur dispersion dans l'environnement.

Les pressions de sélection liées à l'environnement (plantes hôtes, pratiques culturales) et les contraintes liées au pathogène (mode de reproduction et de dispersion) sont parfois responsables de la prolifération de variants (McDonald et Linde, 2002).

II – 2 – Résistance horizontale

Elle se définit comme une résistance partielle à toutes les races du pathogène. Elle ne présente pas d'interactions hôte-parasite et ne correspond pas au schéma « gène pour gène ». Elle est stable et d'hérédité polygénique (Robinson, 1976 ; Rappilly, 1991). Il est communément admis que la résistance horizontale présente une bien meilleure durabilité que les résistances verticales, mono ou oligogéniques. La résistance horizontale peut être due aux autres mécanismes de résistance des plantes comme la synthèse des PR-protéines ou les phytoalexines. Il s'agit d'une résistance cumulative (Parlevliet, 2002).

Elle apparaît après disparition de l'efficacité des gènes majeurs. Elle est considérée comme une résistance résiduelle (Robinson, 1976). Parfois, suite à des paramètres environnementaux extrêmes, la résistance horizontale ne s'exprime pas totalement. Cette inhibition de la résistance n'est que temporaire et retrouve son niveau initial avec le retour des conditions normales (Robinson, 1976).

Les composantes de la résistance quantitative (germination des conidies, efficacité de l'infection, période de latence et production de conidies) sont mesurées chez des variétés résistantes et sensibles de pois (*Pisum sativum*) à *Erysiphe pisi* (agent du mildiou) (Viljanen-Rollinson *et al.*, 1998). La présence d'une résistance quantitative chez la plante hôte n'affecte pas la germination des conidies mais diminue l'efficacité d'infection de 34 % par rapport à la variété sensible. La longueur de la période de latence n'est pas modifiée. La production de conidies par unité de surface foliaire est réduite de 25 %. Le taux maximum de sporulation par jour et par unité de surface de 33 % diminue par rapport à la variété sensible.

En absence de résistance absolue mais avec une large gamme de niveaux de résistance quantitative, la résistance du blé et du triticale à la fusariose est un cas typique de résistance horizontale (Kolb *et al.*, 2001). Castro *et al.*, (2003) ont démontré qu'il était possible d'associer résistance majeure et résistance partielle dans le cas de la rouille de l'orge *Puccinia striiformis* f.sp. *hordei*.

Grâce aux techniques de la biologie moléculaire, les régions chromosomiques impliquées dans la résistance horizontale ont pu être identifiées chez des plantes hôtes. Les « Quantitative Trait

Loci » (QTLs) sont situés sur ces régions. Plusieurs études ont été réalisées visant à identifier les QTL de résistance pour augmenter l'efficacité des programmes d'amélioration des plantes contre les pathogènes comme chez les pathosystèmes : *Bremia lactucae* sur laitue (Hand *et al.*, 2003), *Phytophthora capsici* (Minamiyama *et al.*, 2007) sur poivre, *Phytophthora infestans* sur pomme de terre (Sliwka *et al.*, 2008), et *Diaporthe helianti*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Phoma macdonaldii* sur le tournesol (Mestries *et al.*, 1998 ; Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002 ; Bert *et al.*, 2002 ; Bert *et al.*, 2004 ; Alfadil *et al.*, 2007 ; Darvishzadeh *et al.*, 2007).

La carte des QTLs est indépendante de la saison, de l'environnement ou de la race du champignon pathogène (Lindhout, 2002).

Les gènes majeurs de résistance impliqués dans la résistance race spécifique et les QTL de résistance responsables de la résistance polygénique sont généralement distincts (Delourme *et al.*, 2006).

II – 3 – Durabilité de la résistance

Les deux types de résistance des plantes leur permettent d'affronter de nombreux microorganismes pathogènes. Les gènes responsables de la résistance verticale ou race spécifique, lorsqu'ils sont activés par un pathogène, conduisent à l'activation des gènes de défense qui produiront des molécules capables d'inhiber ce dernier mais ils sont rapidement contournés. A contrario, la résistance horizontale est universelle. Elle met en jeu des gènes qui permettent une résistance partielle semble-t-il plus durable que la résistance verticale.

La durabilité de la résistance est un élément à prendre en considération lorsque l'on souhaite limiter les dégâts provoqués par les parasites des plantes sur le long terme.

Johnson (1981, 1984) a défini la durabilité de la résistance comme la persistance de son efficacité dans l'espace et dans le temps lorsque les hôtes résistants sont utilisés pendant de longues périodes, sur une grande surface et en présence du pathogène.

Lorsqu'un nouveau traitement chimique est introduit face à une maladie, ce n'est qu'une question de temps pour qu'il perde son activité. Dans le nouveau contexte défini par le « Grenelle de l'environnement » (diminution de 50 % des traitements chimiques dans les dix prochaines années), les agriculteurs deviennent de plus en plus tributaires de la résistance génétique des cultivars, ce qui constitue un challenge important pour les sélectionneurs (Tourvieille de Labrouhe, Vear comm. pers.) et nécessite une meilleure connaissance des pathogènes.

Lorsque le gène majeur de résistance est contourné, il est nécessaire de remplacer la variété devenue sensible par une autre variété possédant un autre gène majeur de résistance. Le problème de la durabilité des résistances se pose alors avec acuité (Pietravalle *et al.*, 2006). Les

exemples de contournement rapide de gènes majeurs de résistance montrent qu'une monoculture d'une variété présentant une résistance totale sélectionne parmi la population d'agents pathogènes les races les plus virulentes (McDonald et Linde, 2002). Le maintien de l'efficacité de la résistance doit prendre en compte la dynamique d'évolution du bioagresseur (McDonald et Linde, 2002).

De nombreux facteurs peuvent influencer le temps mis par un pathogène pour contourner un gène de résistance verticale selon Parlevliet (2002) :

- * L'environnement, qui peut affecter considérablement la durabilité de la résistance (Parlevliet, 1993).

- * Les pratiques agronomiques : l'utilisation d'un seul cultivar sur une grande surface peut faciliter la progression d'un pathogène. Les populations pathogènes soumises à la pression de sélection exercée par l'utilisation des variétés résistantes s'adaptent à cette pression en contournant les gènes de résistance. L'association en culture, de cultivars possédant des niveaux de résistance partielle variable, montre une capacité à diminuer la sévérité des attaques (Mundt, 2002 ; Andrivon *et al.*, 2003).

- * Le respect des pratiques culturales capables de limiter la quantité d'inoculum dans le sol, comme la rotation des cultures, la destruction des débris (Turkington *et al.*, 2000).

Parfois un seul gène peut conférer une résistance durable. C'est le cas, par exemple la résistance à la maladie du chou jaune causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*. Elle est monogénique (Walker, 1930) et a gardé son efficacité pendant 90 ans minimum (Bosland et Williams, 1988). La résistance à la rouille des feuilles chez les céréales provoquée par *Puccinia triticina*, est portée par le gène *Lr 34*. Ce gène a permis de limiter la maladie pendant 30 ans en Amérique du Nord, en Amérique du Sud et en Australie (Kolmer, 1993, McIntosh et Brown, 1997). L'émergence des nouvelles virulences dépend essentiellement de l'évolution des gènes d'avirulence chez les pathogènes. Les conditions culturales n'ont probablement pas créé dans ces exemples une pression de sélection favorable à l'apparition rapide de nouvelles souches virulentes.

Par contre, plusieurs études ont montré que des gènes majeurs ne présentent pas une durabilité de résistance importante (McDonald et Linde, 2002). La résistance à la rouille jaune chez le blé provoquée par *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* est contrôlée par les gènes *Yr*, l'utilisation du gène *Yr17* pendant 2 ou 3 saisons a conduit à l'apparition des nouvelles virulences en Angleterre (Bayles *et al.*, 2000). L'utilisation des gènes *Pc36*, *Pc57* et *Pc70* chez l'avoine de 1990 à 2000 contre *Puccinia coronata* a engendré une augmentation significative de la virulence du pathogène (Leonard, 2003).

II – 4 – Potentialités évolutives des populations de pathogènes

La durabilité des gènes majeurs de résistance contre un pathogène est affectée par la potentialité évolutive des populations de ce pathogène. Les pathogènes présentant le plus grand risque de contournement de la résistance apportée par un ou peu de gènes majeurs de résistance, sont ceux qui possèdent un haut potentiel d'évolution.

Plusieurs facteurs interviennent dans l'évolution des populations : les mutations, la dérive génétique, l'introduction de gènes, les systèmes de reproduction et la sélection (McDonald et Linde, 2002).

Les mutations créent de nouvelles souches du pathogène avec un nouveau profil de virulence, mais qui peuvent avoir perdu l'efficacité vis-à-vis d'anciens gènes de résistance. Les taux de mutation sont généralement faibles, cependant Wellings et McIntosh (1990) ont montré que les différents pathotypes de rouille jaune (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) présents en Australie dérivait tous d'un ancêtre commun par mutation. Guerin et Cam (2004), Guerin *et al.*, (2007) ont émis l'hypothèse que la virulence vis-à-vis du gène *Vf* de *Venturia inaequalis* proviendrait d'une seule mutation. Celle-ci a été suivie d'une différenciation séparée des populations virulentes et non virulentes qui semblerait interdire toute recombinaison sexuée entre ces deux populations.

La dérive génétique est due soit à la survie des quelques individus suite à un événement « catastrophique » qui diminue la taille des populations de façon drastique, soit à la colonisation d'un nouvel hôte par quelques individus ne représentant qu'une faible proportion de la variabilité de la population initiale (l'événement le plus courant dans la pathologie des plantes). La dérive génétique diminue la variabilité des populations.

L'introduction des gènes due aux migrations participe activement à l'évolution des populations de pathogènes (Brown et Mogens, 2002). Ce phénomène permet l'échange d'individus séparés géographiquement. L'homme contribue beaucoup à ce phénomène.

Les systèmes de reproduction affectent la distribution des gènes à l'intérieur et entre les individus d'une population. Elle peut être de type asexuée, sexuée ou mixte. Les pathogènes les plus virulents sont ceux présentant les deux types.

La sélection est le facteur principal conduisant aux changements dans la fréquence d'apparition de nouvelles virulences.

Les populations de *Leptosphaeria maculans* capables de contourner les résistances sont issues principalement de 3 facteurs : la recombinaison sexuée, l'effectif de la population et le flux de gènes à travers la dissémination des ascospores (Fernando *et al.*, 2007).

McDonald et Linde (2002) ont suggéré que les pathogènes présentant un cycle sexué qui assure le brassage génétique, étaient capables d'évoluer plus vite que les pathogènes ne possédant que la reproduction asexuée. De même, ceux qui produisent des propagules asexuées distribuées sur de longues distances entraînent le contournement des gènes de résistance verticale de façon plus importante que ceux qui présentent une courte distance de dispersion des propagules (Tableau 2). En se basant sur les travaux de Brent et Hollomon (1998) qui ont établi un diagramme de risques entre l'utilisation des fongicides et l'acquisition de résistances des champignons phytopathogènes, McDonald et Linde (2002) ont établi un diagramme de risques tenant compte du type de reproduction et de l'introduction de gènes. Les valeurs des notes de risque sont réparties sur une échelle notée de 1 à 9 (Figure 1). Ces chiffres sont sans unité et n'ont aucune signification biologique. Une note de 0 à 3 est attribuée au type de reproduction et à l'introduction des gènes en considérant que ces 2 paramètres influent de manière équivalente sur le potentiel d'évolution et que leurs effets se multiplient. La valeur de la note de risque est égale à la note correspondant au type de reproduction multipliée par celle de l'introduction de gènes. Les pathogènes présentant exclusivement une reproduction asexuée et un faible potentiel d'introduction de gènes sont classés dans la catégorie du plus petit risque (1), au contraire ceux qui possèdent un cycle de reproduction sexué et des spores asexuées pouvant être transportées sur de longues distances sont classés dans la catégorie du risque maximum (9). Dans cette catégorie sont répertoriés les agents pathogènes responsables des mildioux. Les mêmes auteurs ont suggéré que la valeur de la formule de risque doit être multipliée par 0,5 dans le cas d'une population présentant un petit effectif et par 1,5 dans le cas inverse.

La coévolution entre les pathogènes et les plantes hôtes suggère le développement des moyens déjà existants et/ou acquis pour mieux s'adapter à un environnement donné. Les plantes possèdent les deux types de résistance : verticale et horizontale, et les pathogènes ont une potentialité évolutive qui peut intervenir dans l'adaptation du pathogène aux deux types de résistance. Un niveau élevé de mutation, une large variabilité génétique, un niveau élevé d'introduction de gènes, un système mixte de reproduction et une réaction rapide à la pression de sélection augmentent la capacité d'évolution des agents pathogènes face à leurs plantes hôtes.

II – 5 – Relations entre la durabilité de la résistance et la pression de sélection exercée par l'hôte

La multiplication du pathogène pendant plusieurs générations sur des hôtes particuliers applique une pression de sélection sur la population parasitaire. En effet, les individus les mieux adaptés sur ces hôtes bénéficient d'un avantage sélectif.

Rouxel *et al.*, (2003) ont analysé la proportion des gènes d'avirulence *AvrLm1*, *AvrLm2* et *AvrLm4* sur 1011 isolats de *Leptosphaeria maculans* entre 1990 et 2000 et l'effet de la pression de sélection exercée par l'utilisation massive d'un cultivar de *Brassica napus* portant le gène de résistance *Rlm1*. Ils notent une diminution des isolats porteurs du gène *AvrLm1* au cours des années, contribuant ainsi à une perte d'efficacité du gène *Rlm1* et l'absence des isolats porteurs le gène *AvrLm2*. Cependant les isolats porteurs le gène *AvrLm4* sont retrouvés en pourcentages variables selon l'année de prélèvement des échantillons et l'origine géographique. Ces travaux mettent en évidence le risque de contournement de la résistance par l'évolution du profil génétique du pathogène lorsqu'un cultivar est utilisé de façon trop importante.

Des résultats récents (Andrison *et al.*, 2007), montrent que *P. infestans* s'adapte à la population de cultivars dominants dans une région, sans tenir compte de leur niveau de résistance et peut contourner la résistance partielle polygénique.

La pression de sélection exercée par le génotype de l'hôte sur les populations de pathogène semble donc complexe et, sans doute, spécifique à chaque pathosystème.

Parmi tous les Oomycètes pathogènes, *Plasmopara halstedii* agent du mildiou du tournesol (*Helianthus annuus*) a retenu notre attention en raison des dégâts occasionnés aux cultures, suite à l'évolution de ce parasite qui contourne les résistances variétales

III – Le couple *Plasmopara halstedii* / *Helianthus annuus*

III – 1 – Tournesol

Le tournesol cultivé (*Helianthus annuus* L.) est l'une des principales sources d'huile végétale. Il appartient à la famille des Composées, tribu des *Heliantheae*. La forme cultivée est souvent distinguée comme la variété botanique « *macrocarpus* » (Vear, 1992). Le cycle complet du tournesol est compris entre 80 à plus de 170 jours selon la précocité de la variété, le climat et la latitude.

Le capitule est formé d'un plateau parenchymateux appelé « éponge » correspondant à la partie végétative, et d'une partie « fertile » portant les organes sexuels. Il mesure de 5 à 50 cm de diamètre et porte deux sortes de fleurs (Vear, 1992) :

- Les fleurs ligulées ou rayonnées (à grande corolle jaune) sont les premières à apparaître. Elles sont stériles et disposées sur un seul rang à l'extérieur du capitule.
- les fleurs tubulées ou fleurons, de 50 à 3000 par capitule, produisent les akènes après pollinisation et fécondation.

Le tournesol est de préférence allogame, mais l'autofécondation est généralement possible. La pollinisation est assurée par les abeilles. Il a une phase végétative de type diploïde « $2n = 34$ chromosomes » selon Heiser (1976).

Originaire de l'Ouest de l'Amérique du Nord, il fut importé par les Espagnols au XVI^e siècle. Sa culture s'est développée particulièrement en Russie. Cette plante gagne du terrain après la création des variétés hybrides sélectionnées sur leurs performances agronomiques (Vear, 1992). La teneur en huile dans les variétés améliorées varie de 45 à 50 %. La qualité de l'huile, particulièrement sa richesse en acide linoléique, fait que le tournesol est aujourd'hui, avec le colza et l'olivier, l'une des trois principales sources d'huile en Europe. Les découvertes de la stérilité mâle génique, de la stérilité mâle cytoplasmique (Leclercq, 1969) et de sa restauration (Kinman, 1970), et la création d'hybrides résistants aux ravageurs et aux maladies ont permis la culture du tournesol dans les cinq continents avec comme grands pays producteurs : La Russie, l'Argentine, les Etats Unis et l'Union Européenne (U.E.).

En France, la surface cultivée en tournesol est passée de 710 000 ha en 2000 à 540 000 ha en 2007 (Tableau 3). Cette réduction peut s'expliquer par l'augmentation des surfaces cultivées en colza (Tourvieille de Labrouhe comm. pers.). Alors que dans l'Union Européenne, la surface cultivée en tournesol a augmenté de 2 204 000 ha en 2004 à 3 399 000 ha en 2007 (Tableaux 4 et 5).

III – 2 – Mildiou du tournesol

Dans les classifications récentes, les Peronosporomycetes contiennent six ordres : Pernosporales, Pythiales, Leptomitales, Rhipidiales, Saprolegniales et Sclerosporales. Les Pythiales contenant les familles Pythiogetonaceae et Pythiaceae avec les genres *Pythium* et *Phytophthora* (parasites facultatifs). L'ordre des Pernosporales, parasites obligatoires infecte souvent des parties aériennes d'angiospermes. Cet ordre contient deux familles : les Albginaceae et les Peronosporaceae (mildiou). Cette famille contient 8 genres et 600 espèces parmi lesquelles on trouve *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et Toni, agent du mildiou du tournesol (Riethmuller *et al.*, 2002 ; Goker *et al.*, 2007).

A l'exception de l'Australie, ce pathogène se retrouve dans tous les pays producteurs du tournesol. D'origine nord-américaine (Orellana, 1970), il est constitué d'un groupe qui peut infecter le tournesol et d'autres espèces de Composées : *Xanthium sp.*, *Bidens sp.*, l'ambroisie ou les autres centaurees. En se basant sur sa morphologie et sa physiologie, Novotelnova (1966) propose trois formes biologiques : *P. halstedii* f. *helianthi* qui attaque strictement *Helianthus annuus* (tournesol), *P. halstedii* f. *perennis* et *P. halstedii* f. *patens* qui infectent des *Helianthus*

pérennes. Cette position est néanmoins insuffisante pour déterminer plusieurs espèces (Sackston, 1981).

III – 2 – 1 – Biologie de *P. halstedii*

P. halstedii est un parasite biotrophe, qui ne peut se développer que sur le végétal vivant. Il a deux phases de vie différentes : la phase générative (sexuée) et la phase végétative (asexuée) selon Tourvieille de Labrouhe *et al.*, (2000) [Figures 2 et 3].

Le cycle biologique commence par la germination d'une oospore, forme de résistance du champignon, issue de la reproduction sexuée, conservée dans le sol et dans les débris de culture. Les oospores sont disséminées dans le sol par les eaux de ruissellement. Elles germent pour donner des zoosporanges (Novotelnova, 1966 ; Delanoë, 1972). Le contenu des zoosporanges se transforme en zoospores flagellées qui germent à proximité des racines au niveau de la zone pilifère. La libération des zoospores et leur germination sont affectées par les conditions environnementales. La température optimale du processus se situe entre 15 et 18°C et le pH optimal entre 6 et 8. Les zoospores libérées nagent quelques temps dans la fraction d'eau libre du sol. En entrant en contact avec la plante, elles perdent leur mobilité (enkystement) et émettent un tube germinatif qui pénètre dans les tissus de la plante (contamination primaire). Si l'humidité est très importante, le mycélium, qui se développe de manière systémique au détriment de la plante, produit de nouveau des sporangiophores (phase asexuée) composant les sporulations blanches, visibles à la face inférieure des feuilles, les zoosporanges sont disséminés par le vent (contaminations secondaires).

En fin de maturité des plantes, des oospores se forment dans les feuilles infectées correspondant à la sporulation sexuée (Viranyi, 1988). Il y a différenciation du mycélium en oogones (gamètes femelles) et anthéridies (gamètes mâles) qui forment par fusion (fécondation) des oospores. Elles se forment surtout sur les organes sénescents (Nishimura, 1922). Elles peuvent assurer la conservation du champignon durant plusieurs années.

III – 2 – 2 – Races de *P. halstedii*

P. halstedii existe sous forme de races physiologiques ou pathotypes. Une race est une population d'individus capables d'attaquer les mêmes génotypes du tournesol. En France en 1966, à l'arrivée du mildiou du tournesol, une seule race du champignon était présente, la race 100, appelée également race européenne (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). Depuis, et en parallèle avec l'extension de la culture, de nombreuses autres races ont fait leur apparition (Tourvieille de Labrouhe, 2004). Quinze pathotypes sont présents sur le territoire français : la race 100 (race européenne), 4 races également présentes aux Etats-Unis (300, 700, 703, 710), 2

rares découvertes en Europe (730 et 770) et 8 races qui n'ont été trouvées qu'en France (304, 307, 314, 334, 704, 707, 714 et 717) selon Tourvieille de Labrouhe (comm. pers.)

Ces races sont caractérisées en fonction de la réponse à l'infection de lignées de tournesol appelées « hôtes différentiels » (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). Le codage des races résulte de la réponse du parasite à des séries de 9 hôtes différentiels, D1 à D9 différant par leurs gènes de résistance « *Pl* », classés en triplète. Une note est établie pour chaque triplète : en cas de résistance des trois génotypes de la triplète, la note est de 0 ; en cas de sensibilité S d'au moins un des génotypes, la note correspond à la somme des coefficients attribués à chaque génotype de la triplète : 1 pour le premier, 2 pour le deuxième, 4 pour le troisième : une race virulente sur les 3 génotypes d'une triplète aura donc la note $1 + 2 + 4 = 7$ pour cette triplète. La nomenclature complète de la race correspond à la juxtaposition des notes obtenues avec les trois triplètes, par exemple : 700 pour la race à laquelle la première triplète est entièrement sensible et les deux suivantes sont entièrement résistantes (Tableaux 6 et 7).

La caractérisation d'une race de mildiou par ces techniques traditionnelles faisant appel aux lignées différentielles nécessite à la fois du temps (entre 2 et 6 semaines) et de l'espace. La mise au point d'une technique rapide de caractérisation à l'aide de l'outil moléculaire, reposant sur la Polymerase Chain Reaction (PCR) permettrait le typage des races de *Plasmopara halstedii* sans pour autant permettre la caractérisation de la race présente (Roeckel-Drevet *et al.*, 1999 ; Ioos *et al.*, 2007).

III – 2 – 3 – Variabilité morphologique chez *P. halstedii*

Plusieurs études ont été réalisées pour analyser la morphologie du champignon sur :

- 1- les organes asexués qui contiennent les zoosporanges et les zoospores.
- 2- les organes sexués qui englobent les oogones, anthéridies et les oospores.

Les zoosporanges formés sur la partie aérienne de la plante, sont de forme ovoïde à ellipsoïdale, pourvus d'une papille. Leur taille est variable selon les auteurs : de 30-33 μm à 36-57 μm (Nishimura, 1922), de 14-20 μm à 18-30 μm (Hall, 1989) et de 12-16 μm à 27-40 μm (Spring *et al.*, 2003).

Les zoosporanges formés dans les sols prennent souvent une forme de poire ou de citron et sont, en moyenne, plus grands que ceux qui sont produits sur la partie aérienne. La taille des zoosporanges souterrains est de 33-48 μm à 56-90 μm (Delanoë, 1972).

Les zoospores ont 6-12 μm de diamètre, elles se présentent sous deux morphologies bien distinctes : l'une en forme de « rein » et l'autre en forme de « poire », pourvues de flagelles (Delanoë, 1972).

Les anthéridies (mâles) ont une forme aplatie, irrégulière, d'un diamètre de 12 à 30 μm . Elles sont plus petites que les oogones (femelles) selon Delanoë (1972).

La taille des oospores correspond à la taille des oogones qui est variable de 33,6 x 39,9 à 44,1 x 52,5 μm (Cohen et Sackston, 1974b).

III – 2 – 4 – Variabilité moléculaire chez *P. halstedii*

Une étude sur la variabilité moléculaire des races françaises a été réalisée par Roeckel-Drevet *et al.*, (1997) à l'aide des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Un très faible polymorphisme est observé entre les races : le plus faible pourcentage de similitude obtenu est de 88,9 % entre la race 300 et la race 710.

Comment expliquer ce très faible polymorphisme ou même cette absence de polymorphisme inter – race ? Tout d'abord, l'utilisation de variétés de tournesols résistantes peut avoir conduit à la survie de seulement quelques races de *P. halstedii* qui sont alors devenues prépondérantes dans certaines régions. Ainsi, la race 710 qui est apparue en 1988 dans le département de l'Indre en France, est à présent trouvée sur l'ensemble du territoire français (Lafon *et al.*, 1996). Ensuite, il est possible que certaines races françaises proviennent d'une population importée des Etats-Unis, et qu'elles n'aient pas encore eu le temps de se différencier de manière importante. Le polymorphisme observé en RAPD de 77 isolats de *P. halstedii* recueillis dans douze pays de quatre continents a été étudié à l'aide de vingt et une amorces (Roeckel-Drevet *et al.*, 2003). Les indices de similitude se situaient entre 89 % et 100 %. Les races les plus différenciées, démontrent les indices de diversité intrinsèque les plus bas ce qui indique qu'elles sont apparues récemment avec d'importants effets d'étranglement. Le flux génétique entre les pays, peut se faire par le biais d'échanges commerciaux. Spring *et al.*, (2006) ont travaillé sur des ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomal. Leurs résultats mettent en évidence deux groupes de population : le premier contient les pathotypes 100, 310 et 330, le deuxième les pathotypes 700, 701, 703, 710 et 730. Delmotte *et al.*, (2008) ont utilisé des marqueurs EST (Expressed Sequence Tag) pour mettre en évidence l'évolution de la virulence dans les populations françaises de *P. halstedii*. Ils ont trouvé 3 groupes de souches génétiquement différentes : le premier groupe contient les races 100, 300 et 304, le deuxième englobe les races 703, 307, 707, 700, 730 et le troisième contient les races 710, 717, 704, 714, 314 et la race 334 possède une position intermédiaire entre les groupes 2 et 3.

L'identification des gènes d'avirulence chez *P. halstedii* n'est pas réalisée à ce jour. Celle-ci pourrait nous aider à mieux comprendre la dynamique des populations parasitaires, l'évolution des gènes à l'intérieur du génome et entre les individus d'une population de pathogène (Gout *et*

al., 2007) ainsi que leur rôle éventuel dans l'expression du pouvoir pathogène (Leach *et al.*, 2001).

III – 2 – 5 – Modalités de l'infection et les symptômes de la maladie

L'utilisation de techniques de contaminations artificielles a permis de mettre en évidence que la pénétration de *P. halstedii* pouvait avoir lieu au niveau de la racine, de l'hypocotyle, des cotylédons et des feuilles et également au niveau du méristème apical (Allard, 1978).

Sur la base de l'origine de l'inoculum et du type d'organe atteint, son cycle infectieux comporte deux phases.

– La contamination primaire

Cette phase souterraine a pour origine les oospores, qui seraient seules responsables du déclenchement de l'infection primaire (Nishimura, 1922). En conditions favorables d'humidité et de température, les oospores germent puis émettent un zoosporange, qui libère des zoospores biflagellées. Après une phase de déplacement dans le sol, les zoospores peuvent atteindre les tissus d'une plante-hôte tels que les racines et entraîner une fonte des semis ou un nanisme très prononcé des plantes. Un mycélium intercellulaire se répand dans toute la plante. Une fructification se produit au niveau de la face inférieure des cotylédons ou des feuilles (Figure 4). Elle sera à l'origine des contaminations secondaires (Allard, 1978).

– La contamination secondaire

Cette phase, essentiellement aérienne, est considérée comme un facteur important de dissémination de la maladie. Les jeunes plantules présentent un feutrage blanchâtre sur les deux faces des cotylédons et sur la face inférieure des feuilles. Ce feutrage est composé de sporangiophores dont l'extrémité porte des sporanges. La dissémination, par le vent par exemple, de ces sporanges qui donneront des zoospores, est à l'origine des contaminations secondaires qui vont affecter les plantes voisines (Figure 5). Une contamination secondaire très précoce peut conduire à l'apparition des symptômes aussi sévères que lors d'une contamination primaire. Si elle intervient sur des plantes avant le stade « deuxième paire de feuilles », les symptômes sont souvent caractérisés par un nanisme prononcé. A partir de deux paires de feuilles, ils peuvent être non systémiques : ils sont localisés sur les feuilles, sous forme de taches chlorotiques anguleuses, souvent accompagnées du feutrage sur la face inférieure qui correspond aux fructifications.

Selon la précocité de l'attaque de la plante par *P. halstedii*, différents symptômes peuvent être observés (Regnault et Tourvieille de Labrouhe, 1991) :

- des attaques très précoces peuvent conduire à une fonte de semis (flétrissement et mort rapide de la plantule)

- des attaques précoces (avant le stade 4 feuilles) conduisent à un nanisme plus ou moins sévère, à l'apparition de chlorose, de lésions nécrotiques et de sporulation sur les feuilles, l'hypocotyle et les racines. Les plantes nanifiées ont une floraison précoce et différencient un capitule réduit et déformé, anormalement dressé. Au stade adulte, la plante est le plus souvent stérile.

- des attaques tardives, dues aux contaminations secondaires, provoquant l'apparition de taches chlorotiques sur les feuilles. Mais les plantes atteintes gardent une allure normale. Ces infections secondaires tardives restent localisées.

Avec l'apparition des nouvelles races de mildiou depuis le début des années 2000, aucune variété de tournesol ne garantit une protection définitive, les pratiques agronomiques ont plus que jamais leur place dans la lutte contre la maladie.

III – 2 – 6 – Moyens de lutte dans le pathosystème *P. halstedii* / *H. annuus*

P. halstedii est considéré comme « un organisme nuisible de quarantaine » par l'union européenne. Afin d'éviter la dissémination de *P. halstedii* par les semences, la circulation des semences de tournesol à l'intérieur de la communauté ainsi que l'importation des semences en provenance de pays tiers est réglementée (directive 2000/29/CE, transposée en droit français, arrêté du 24 mai 2006).

La lutte doit intégrer l'ensemble des moyens de gestion du risque propre à limiter le développement du mildiou du tournesol.

III – 2 – 6 – 1 – La lutte culturale

L'apparition de nouvelles races et notamment des races résistantes au métaxyl et l'absence de moyen de lutte contre des attaques en cours de culture nécessitent l'application simultanée de règles agronomiques et culturales (note commune SPV- CETIOM- INRA 2007) :

- semer dans des parcelles bien ressuyées (décaler le semis après une pluie).
- allonger les rotations (1/3 au lieu de 1/2).
- détruire les repousses du tournesol qui peuvent servir de source d'inoculum.
- utiliser exclusivement des semences certifiées résistantes aux races identifiées dans la région.

III – 2 – 6 – 2 – La lutte chimique

L'apparition en France, en 1988, de nouvelles races de *P. halstedii* auxquelles toutes les variétés de tournesol se montraient sensibles, a dirigé la lutte vers l'utilisation du seul fongicide systémique commercialisé : le métaxyl. En 1990, le traitement des semences avec des

fongicides est rendu obligatoire par le service de la protection des végétaux, permettant ainsi de limiter l'incidence de cette maladie en l'absence de variété de tournesol résistante.

En 1987, Oros et Viranyi pensaient que l'utilisation de ce produit comportait le risque non négligeable de voir apparaître à grande échelle une race de *P. halstedii* résistante au métalaxyl. Le parasite pouvant envahir le système racinaire des plantes (sensibles ou résistantes), l'entretien et la survie de l'inoculum dans le sol sont ainsi assurés. Une pression de sélection s'exerçant de façon continue sur le parasite, des souches résistantes peuvent apparaître. Effectivement, des isolats prélevés en 1995 et en 1996 présentent une sensibilité moindre au métalaxyl (Penaud *et al.*, 1997 ; Albourie *et al.*, 1998). Actuellement seul le méfénoxam (un isomère du métalaxyl) reste le traitement anti-mildiou des semences autorisé (Tourvieille de Labrouhe, comm. pers.).

III – 2 – 6 – 3 – La lutte génétique

La mise en évidence de l'existence de gènes de résistances monogéniques et dominantes chez certains génotypes de tournesol a permis le développement des techniques de sélection. Cette résistance est contrôlée par des gènes majeurs appelés *Pl* (Vranceanu et Stoenescu, 1970). L'interaction avec le parasite est de type gène pour gène.

La lutte génétique est basée sur l'exploitation de ces résistances et la mise en évidence d'une résistance monogénique complète et mesurable au stade plantule a conduit les sélectionneurs à privilégier l'exploitation de cette résistance qui apparaissait, au moins dans un premier temps, extrêmement efficace. Cependant le parasite possède une capacité d'adaptation très élevée et les gènes de résistance utilisés sont contournés après quelques années de culture du fait de l'apparition de nouveaux pathotypes plus virulents.

Les gènes de résistance de type « race spécifique » sont regroupés sur différents chromosomes (organisés en cluster). Deux clusters majeurs de gènes ont fait l'objet des principales études :

Sur le groupe de liaison 8, **un cluster** a été décrit par Bouzidi *et al.*, (2002). Deux zones distinctes ont été identifiées : l'une portant les gènes de résistance aux races 100 et 300 (gènes *Pl1* et *Pl2*), l'autre portant les gènes de résistances aux races 700, 703 et 710 (gènes *Pl6* et *Pl7*).

Sur le groupe de liaison 13, **un cluster** a été analysé par Radwan (2004) qui porte les gènes *Pl5* et *Pl8*.

Un allèle de résistance *PlArg* conférant la résistance aux races 300, 700, 730, 770 a été localisé sur le groupe de liaison 1 par Dussle *et al.*, (2004)

Actuellement, seules deux sources différentes assurent la résistance des variétés de tournesol à toutes les races de mildiou présentes en France : *Pl8* et *PlArg*. Il apparaît indispensable de rechercher de nouvelles résistances (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005).

En France, l'utilisation de gène *Pl6* a conduit à l'apparition en 2002 des nouvelles virulences 704 et 714 qui surmontent ce gène (Tourvieille de Labrouhe, 2004) et l'utilisation extensive du gène *Pl5* a conduit à l'apparition de la nouvelle race 334 qui surmonte également ce gène (Tourvieille de Labrouhe, 2004). Cette évolution rapide des virulences est attribuée à la mise sur le marché de génotypes disposant des mêmes gènes de résistance (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005). La monoculture d'un ou deux gènes de résistance, produit une pression de sélection sur la population parasitaire et les individus capables de surmonter ces gènes de résistance sont fortement favorisés. En se référant aux travaux de McDonald et Linde, (2002), une valeur de risque évolutif égale à 6 peut être attribuée à *Plasmopara halstedii* qui correspond à la multiplication de la valeur de reproduction mixte = 3 par la valeur de l'introduction moyenne de gènes = 2. La valeur de risque modifiée est de $6 \times 1,5 = 9$ ce qui correspond pour McDonald et Linde, à un risque relativement élevé.

Différentes possibilités s'offrent au sélectionneur pour limiter le contournement des résistances. La plus commune consiste à combiner plusieurs gènes majeurs dans un même cultivar c'est « le pyramidage ». Une autre option consiste à alterner dans le temps et/ou dans l'espace l'utilisation des gènes majeurs afin de provoquer des ruptures dans les pressions de sélection, c'est « l'alternance ». Enfin, De Vallavieille-Pope (2004) montre l'intérêt du « mélange » de cultivars de céréales qui réduit les niveaux de la maladie du fait de la perte d'inoculum due à la présence des plantes résistantes dans les sensibles. Ces stratégies sont envisageables dans le pathosystème mildiou/tournesol du fait de la découverte de plusieurs gènes *Pl* efficaces vis-à-vis des principales races de mildiou présentes en France et de leur localisation sur la carte chromosomique (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005).

Tourvieille de Labrouhe *et al.*, (2005) ont montré que l'accumulation de plusieurs gènes majeurs *Pl* chez le tournesol cultivé contre *Plasmopara halstedii*, si elle n'est pas accompagnée de mesures complémentaires agronomiques (rotation) ou génétique (résistance partielle non-race spécifique), aboutit rapidement à l'apparition de nouveaux pathotypes. La « durée de vie » d'un gène *Pl* dans ces conditions est inférieure à 10 ans. Tourvieille de Labrouhe *et al.*, (2005) ont signalé que la monoculture d'un ou deux gènes de résistance produit une pression de sélection sur la population parasitaire et les individus capables de surmonter ces gènes de résistance sont fortement favorisés.

Des travaux récents ont mis en évidence l'existence chez le tournesol cultivé, d'une résistance quantitative, partielle, non-race spécifique (Vear *et al.*, 2007 ; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008). Les niveaux de résistance du tournesol obtenus sont suffisants pour limiter les pertes de rendement (Vear *et al.*, 2007). Des analyses récentes ont identifié les QTL chez le tournesol et ils

sont généralement distincts des gènes majeurs *Pl* (Vear *et al.*, 2008). L'efficacité de cette résistance dépend essentiellement des conditions climatiques plus ou moins favorables à la maladie (Délos *et al.*, 2000) mais également de l'agressivité des souches de *Plasmopara halstedii*. L'exploitation de la résistance quantitative du tournesol face au mildiou pourrait être utilisée en complément de la résistance due aux gènes majeurs.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Actuellement se pose la question de savoir quelle stratégie peut être mise en place pour assurer une résistance des variétés de tournesol plus durable dans l'avenir

I – Origine du matériel expérimental

Un protocole a été mis en place pour évaluer la durabilité de la résistance monogénique contre *Plasmopara halstedii* (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005). Six parcelles sont semées en hybrides, présentant des niveaux différents de la résistance verticale et sont infectées par un mélange initial constitué de MIL 001 (race 100) et MIL 002 (race 710) en 2001. Des variants différents (races 300, 304, 314, 704 et 714) et des souches de profil 710 ont été obtenus après 4 années de plantation dans ces parcelles en 2005. Ces souches seront utilisées au cours du travail de thèse

I – 1 – Hybrides de tournesol

Pour la mesure de l'impact du choix variétal, 4 hybrides quasi-isogéniques ont été utilisés. Ils ne se distinguent que par leurs gènes de résistance face aux races 100 et 710 de *P. halstedii*. Ils ont été construits à partir de différentes formes des mêmes lignées possédant diverses sources de résistance :

L1 forme a : possédant une source de résistance apportée (*Pl2*) par la lignée de tournesol « RHA274 » (lignée USDA résistante à la race 100).

L1 forme b : possédant les sources de résistance apportées (*Pl2* + *Pl8*) par « RHA274 » et « RHA340 » (lignée USDA résistante aux races 100 et 710).

L2 forme a : ne possédant aucun gène de résistance connu.

L2 forme b : possédant une source de résistance apportée (*Pl6*) par « HA335 » (lignée USDA résistante aux races 100 et 710).

Les hybrides ont été construits de la manière suivante :

H1 = (L1 forme a) X (L2 forme a)

H2 = (L1 forme a) X (L2 forme b)

H3 = (L1 forme b) X (L2 forme a)

H4 = (L1 forme b) X (L2 forme b)

Seul l'hybride H4 combine deux résistances efficaces vis-à-vis des deux pathotypes (100 et 710) présents sur les parcelles d'expérimentation.

Les hybrides utilisés ont été produits en respectant les contraintes imposées aux semences commerciales. Dans ces conditions, il est difficile de garantir une pureté absolue. La présence de quelques plantes ne possédant pas les gènes de résistance attendus peut influencer grandement l'évolution de la population parasitaire. Les comportements des quatre hybrides H1 à H4 vis-à-vis des deux souches de référence 100 et 710 présentes au début de l'expérimentation ont permis de préciser le niveau de pureté variétale des quatre hybrides : H1 ($\approx 99\%$), H2 ($\approx 96\%$), H3 ($\approx 99\%$) et H4 ($\approx 100\%$).

I – 2 – Dispositif expérimental

Il consiste en l'implantation de 6 parcelles expérimentales de 300 plantes environ sous tunnel en filet de 9 x 7 m. Les hybrides sont semés dans des conditions normales de densité (50 000 pieds/ha). L'irrigation est conduite afin de favoriser les infections racinaires puis aériennes (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005) : 7 jours après le semis, 100 mm d'eau sont apportés pour faciliter la réussite des infections au niveau des racines, puis un arrosage réglé sur un humectostat (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 1986) permet d'assurer des conditions favorables aux contaminations secondaires (présence d'eau libre sur les feuilles). Les plantes sont maintenues jusqu'au début de floraison. A ce stade, toutes les plantes saines sont enlevées alors que les plantes malades sont coupées et laissées sur place afin de conserver l'inoculum et que celui-ci suive son cycle naturel d'évolution. Chaque parcelle expérimentale est alors immédiatement travaillée individuellement afin d'enterrer l'inoculum et de préparer le terrain pour le semis de l'année suivante. Le dispositif pluri annuel est présenté dans le Tableau 8 et Figure 6, les 6 parcelles correspondent à :

- **Parcelle Référence** qui est une monoculture de l'hybride H1 sans gène de résistance au pathotype 710,
- **Parcelle Assemblage** qui correspond à la monoculture d'un mélange constitué des 4 hybrides à part égale,
- **Parcelle Alternance** où les 4 hybrides sont cultivés en alternance ; en 2001 par H1, en 2002 par H2, en 2002 par H3 et en 2004 par H4,
- **Parcelle Monoculture I** qui est la monoculture de l'hybride H2 (source de résistance « Ha 335 »),
- **Parcelle Monoculture II** qui est la monoculture de l'hybride H3 (source de résistance « Rha340 »),

- **Parcelle Pyramidage** pour la monoculture de l'hybride H4 qui cumule les 2 sources de résistance.

Un échantillonnage de la population parasitaire présente dans chaque parcelle a été obtenu à la fin de l'expérimentation (2005) en récoltant les souches de mildiou directement à partir d'un échantillon de sol par la méthode décrite par Tourvieille de Labrouhe et Walser (2005). Le prélèvement de terre est effectué sur l'ensemble de la parcelle et sur une profondeur correspondant au lit de semence. Il est réalisé au début du printemps et la terre est directement placée dans une terrine. Les graines de la variété « Airelle », variété très sensible à toutes les races de *P. halstedii* et ne portant pas de gènes de résistance *Pl*, sont mises à pré-germer (2 heures de trempage suivies de 24 heures en humidité saturante à 20°C). Cent graines sont placées dans la terrine et recouvertes de 1 cm de terre. La terrine est placée 48 heures à 18°C dans l'obscurité. Les terrines sont alors complètement immergées dans de l'eau durant 12 heures consécutives puis elles sont maintenues 14 jours à 18°C sous une intensité lumineuse de 12 000 lux. Pour obtenir la sporulation et pour éviter les mélanges entre souches, le 12^e jour, les plantules sont isolées dans des petits piluliers en plastique transparent. Les plantules qui présentent une sporulation sont placées en cryoconservation après 24 heures de dessiccation (Molinero-Demilly *et al.*, 2005).

I – 3 – Souches DU xxxx récoltées dans les parcelles

La caractérisation des profils de virulence de ces souches de *P. halstedii* a été réalisée à l'aide des 9 lignées hôtes différentiels officielles D1 à D9 qui permettent la dénomination internationale (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000).

A partir de cette collection, cinq souches ont été choisies pour mettre en évidence les conséquences de l'apparition de nouvelles virulences sur l'agressivité : DU 1842 = race 300 isolée de la parcelle monoculture I ; DU 1767= race 304 isolée de la parcelle alternance ; DU 1943 = race 314 isolée de la parcelle monoculture II ; DU 1734 = race 704 isolée de la parcelle alternance et DU 1915= race 714 isolée de la parcelle monoculture II.

Pour mettre en évidence l'évolution de l'agressivité sur les populations de profil 710, nous avons choisi pour les parcelles référence, mélange et alternance, 4 souches de façon aléatoire et les 3 seules souches de profil 710, issues de la parcelle monoculture I.

I – 4 – Situation sanitaire

Les parcelles utilisées étaient situées sur le domaine expérimental de l'INRA à Clermont-Ferrand. Elles ont été suivies depuis de très nombreuses années. Les génotypes cultivés sur ces parcelles ne possédaient pas de gène de résistance au mildiou. Ces parcelles n'étaient infectées

que par deux pathotypes : race 100 et race 710. Les parcelles ont présenté des taux d'attaques fluctuants sur les 4 années qui ont abouti à la contamination du sol. Les plantes malades sur les 4 années d'expérimentation ont été de 737 pour la parcelle **Référence**, 128 pour l'**Assemblage**, 249 pour l'**Alternance**, 82 pour la **Monoculture I**, 100 pour la **Monoculture II** et seulement 6 pour le **Pyramidage** (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005).

II – Matériel végétal

Hôtes différentiels : Ceux-ci correspondent à une série de lignées de tournesol hôtes différentiels dénommés D1 à D9, (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000) qui est la base de la nomenclature internationale des pathotypes de mildiou du tournesol.

Géotype de multiplication des isolats : Nous utilisons la variété population russe Pérédovick. Elle est réputée pour ne disposer d'aucun gène *Pl* de résistance vis-à-vis du mildiou.

Matériel végétal pour les tests d'agressivité : Nous avons recherché des géotypes bien connus pour leur comportement vis-à-vis du mildiou en conditions naturelles et qui ne possédaient aucun gène majeur de résistance au mildiou (tout au moins vis-à-vis des pathotypes français). Les résultats obtenus sur 4 années d'expérimentation en extérieur sur le site de l'INRA à Clermont-Ferrand nous ont conduit à choisir les lignées de tournesol « GB, sensible » « BT, moyennement résistante » et « FU, résistante » qui représentent la gamme de comportement connue chez *H. annuus* (Vear *et al.*, 2007 ; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008). L'ensemble du matériel végétal est multiplié à l'INRA à Clermont-Ferrand.

III – Conditions de réalisation des tests

Les graines dont les radicules atteignent une longueur comprise entre 0,5 et 1 cm sont infectées à l'aide d'une suspension fraîche de zoosporanges prélevés sur des plantules infectées de la variété population Pérédovick et obtenus après 48 heures d'humidité relative saturante. L'infection est garantie par un trempage de 3 heures dans une suspension ajustée avec une cellule de Malassez à 10^5 zoosporanges par ml (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). Les conditions climatiques dans les chambres de culture sont présentées dans l'annexe (page 131).

IV – Méthodes

IV – 1 – Méthode pour obtenir des isolats monozoosporanges

But : isoler un seul zoosporange et le déposer sur un disque foliaire, ensuite incuber ce disque dans les conditions favorables pour permettre le développement de *P. halstedii* (Sakr *et al.*, 2007) [figure 7].

IV – 2 – Méthode pour mesurer l'agressivité

But : une souche plus agressive provoque des symptômes plus importants qu'une souche moins agressive après avoir sur des plantes infectées dans des conditions favorables à la sporulation.

Nous avons mesuré quatre critères de l'agressivité :

- Le taux de réussite des infections = le pourcentage de plantes sporulées après 13 jours d'incubation « % d'infection ». L'infection est considérée comme réussie lorsque la plantule présente une sporulation à la surface des organes aériens. Le taux est calculé 13 jours après l'infection et il est exprimé en pourcentage de plantules présentant une sporulation quels que soient les tissus concernés et l'importance de la sporulation observée. Pour chaque souche, la mesure porte sur 60 plantules de 3 répétitions.

- La durée de la période qui s'écoule entre l'infection et la sporulation sur 80 % des plantes infectées = « durée de latence » soit le cotylédon sporule ce qui correspond à une plante malade, soit le cotylédon ne sporule pas ce qui correspond à une plante saine (Figure 8). Afin de mesurer la durée de la période de latence nécessaire pour obtenir 80 % des plantes présentant une sporulation, nous avons réalisé 6 traitements différents : soixante graines germées infectées sont repiquées dans 6 pots différents (10 graines par pot). Un pot est recouvert d'un sac en matière plastique après une durée d'incubation de 7 jours après le repiquage, puis 8, 9, 10, 11, 12 jours pour les autres pots. Après 24 heures d'humidité saturante, on note le nombre de plantules présentant une sporulation sur les organes aériens, la lecture est de type tout ou rien. Ce nombre est ramené au nombre de plantes exprimant des symptômes après 13 jours d'incubation ce qui nous permet de calculer le pourcentage de plantes malades exprimant des symptômes pour chaque durée d'incubation. Ces données permettent de tracer une courbe (courbe de tendance polynomiale la mieux corrélée) du taux de sporulation en fonction de la durée d'incubation et pour chaque souche de calculer la variable « durée de la période de latence » qui est la durée d'incubation nécessaire pour avoir 80 % des plantes malades ayant sporulées.

Pour chaque souche, l'expérience est reconduite 3 fois.

- La densité de sporulation sur les cotylédons obtenue après 13 jours d'incubation = « densité de sporulation » (Figure 9). Du fait de la grande variabilité de taille des zoosporanges (Sakr *et al.*, 2007) le comptage du nombre moyen de zoosporanges produits par une plantule est réalisé visuellement. Les cotylédons des plantules présentant une sporulation, pour une durée d'incubation donnée, sont regroupés dans un petit récipient, 2mL d'eau physiologique (9g NaCl par litre d'eau permutée) par plantule sont rajoutés et l'ensemble est fortement agité avant comptage (18 observations par échantillon). Les comptages sont réalisés grâce à un microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez. Les analyses statistiques portent sur les concentrations mesurées après 12 et 13 jours d'incubation qui correspondent à la quantité maximale de spores produites par un cotylédon. Les résultats sont exprimés en nombre de zoosporanges (/100) produits par une plantule.

- La taille de l'hypocotyle (du collet à l'insertion des cotylédons) des plantes malades (présentant une sporulation sur la partie aérienne quel que soit l'organe considéré) est mesurée après 13 jours d'incubation (Figure 10). Les données sont exprimées en mm. Pour chaque isolat nous avons mesuré 10 plantes présentant des sporulations, l'expérience est reconduite 3 fois.

Ces critères ont été définis comme les plus pertinents par l'analyse bibliographique (Miller *et al.*, 1998 ; Sinclair et Griffiths, 2000 ; Carlisle *et al.*, 2002 ; Bonde *et al.*, 2006).

IV – 3 – Analyses statistiques

Les analyses statistiques réalisées sur les données de l'agressivité ont été effectuées avec le logiciel StatBox 6.7® (GrimmerSoft) et le niveau de signification = 0,05.

Les pourcentages ont été transformés avec la fonction Arcsinus $\sqrt{}$ avant analyses statistiques.

La méthode de la randomisation totale est utilisée pour traiter la variabilité *intra* et *inter*-souche au niveau de tous les critères de l'agressivité. La méthode de l'analyse en bloc est utilisée pour traiter la variabilité *intra* pour la densité de sporulation.

Le test de Newman-Keuls (P=0,05) a été utilisée pour regrouper les moyennes homogènes.

Les coefficients de la corrélation (Pearson r) ont été calculés par l'utilisation de toutes les valeurs moyennes de chaque isolat pour comparer les critères analysés.

L'analyse en composantes principales a été utilisée pour comparer ensemble les différentes données observées sur les différentes souches. **L'analyse en composantes principales** (ACP) est une méthode mathématique d'analyse des données qui consiste à rechercher les directions de l'espace qui représentent le mieux les corrélations entre n variables aléatoires.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont fait l'objet de quatre publications dans des revues internationales : deux sont acceptées, une acceptée après révision et une a été soumise ; une cinquième publication a été présentée lors d'un congrès international.

Afin d'étudier la variabilité intra et inter races de *P. halstedii*, l'obtention de souches monosporanges s'est avérée indispensable. Actuellement les souches sont isolées à partir des sporulations d'une ou plusieurs plantes malades. Ces plantes ont pu être contaminées par plusieurs zoospores. Les souches récoltées sont probablement des populations d'individus ayant en commun leur profil de virulence.

De plus, une population présentant un profil de virulence complexe peut correspondre à un mélange de plusieurs individus avec des virulences différentes. La présence d'un pathotype avirulent peut entraîner la résistance d'une plante qui serait normalement sensible à un pathotype virulent lui aussi présent mais qui de ce fait passera inaperçu. L'obtention de souches monosporanges permettra de lever le doute sur un éventuel mélange de pathotypes chez une souche présentant un nouveau profil de virulence ainsi que la validation d'une éventuelle variabilité inter race autre que celle liée à la virulence.

La méthode mise au point pour obtenir ces souches monosporanges est développée dans le premier article.

Au cours de l'analyse bibliographique, il s'est avéré que la caractérisation de la composante quantitative (l'agressivité) du pouvoir pathogène des souches de *P. halstedii* n'a fait l'objet d'aucune publication. Ce parasite est un biotrophe strict, l'étude des facteurs de l'agressivité ne pourra se faire qu'en coculture avec sa plante hôte. Un protocole permettant d'estimer des critères d'agressivité liés au processus infectieux a été développé. Le choix s'est porté sur deux paramètres : la durée de latence, c'est-à-dire le temps qui sépare l'infection de l'apparition des premiers symptômes et la densité de sporulation.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de la deuxième publication.

Lors de l'étude de la variabilité d'une espèce fongique, les caractères morphologiques sont très souvent utilisés : aspect des thalles sur différents substrats, forme des organes de reproduction, etc... Pour un parasite biotrophe strict tel que *P. halstedii*, ces critères ne peuvent être pris en compte puisque l'essentiel du cycle biologique se déroule à l'intérieur des tissus de l'hôte. Pour

P. halstedii, seuls les sporangiophores et les zoosporanges produits à la surface du végétal peuvent être caractérisés et utilisés. La forme des zoosporanges et leur taille ont été notées afin d'établir un éventuel lien entre la variabilité morphologique et le pouvoir pathogène (virulence et agressivité) des souches. L'impact des conditions de culture de *P. halstedii* (durée de latence entre l'infection et l'apparition des symptômes, génotype de la plante hôte) sur les caractères morphologiques des zoosporanges a également été étudié.

Ces résultats sont rapportés dans le troisième article.

Des travaux récents ont mis en évidence l'existence chez *H. annuus* d'une résistance partielle au mildiou, non-race spécifique, indépendante des gènes *Pl*. L'efficacité de cette résistance dépend essentiellement des conditions climatiques plus ou moins favorables à la maladie mais également de l'agressivité des souches du pathogène. L'agressivité de sept pathotypes de *P. halstedii* incluant les races 100 et 710 ainsi que cinq variants issus de ces pathotypes, a été analysée sur trente cinq isolats monosporanges afin de mettre en évidence une relation éventuelle entre la virulence et l'agressivité. Les liens génétiques entre les sept souches ont été précisés à l'aide de douze marqueurs EST.

L'ensemble de ces résultats fera l'objet d'une publication et est présenté dans l'article 4.

Il a été démontré que la pression de sélection exercée par les plantes hôtes sur les champignons phytopathogènes modifie la virulence et l'agressivité des souches. Une analyse de l'impact du mode de gestion des gènes *Pl* sur l'évolution de l'agressivité de souches de *P. halstedii* a été réalisée sur des souches de profil 710 récoltées dans des parcelles correspondant à différentes stratégies : monoculture d'une seule source de résistance, mélange de différentes sources et leur alternance en comparaison avec des souches maintenues en absence de gène *Pl* efficaces.

Ces travaux ont été exposés à la 17^e Conférence Internationale sur le Tournesol à Cordoue et font l'objet de l'article 5.

L'ensemble de ces articles permet de mieux cibler l'impact de l'agressivité dans l'évolution du pouvoir pathogène de *P. halstedii*.

Article 1

Mise au point d'une nouvelle méthode d'obtention de souches mono zoosporanges chez *Plasmopara halstedii*

Dans ce chapitre nous aborderons la nécessité d'obtenir des souches monozoosporanges de *Plasmopara halstedii* afin d'étudier la variabilité intra et inter race de ce pathogène. Les souches de *P. halstedii* sont isolées à partir des sporulations sur une ou plusieurs plantes malades. Il est possible que ces plantes aient été contaminées par plusieurs individus. Les souches récoltées sont probablement des populations d'individus ayant en commun leur profil de virulence. L'obtention de souches monozoosporanges permettra de valider une éventuelle variabilité inter race autre que celle qui est liée à la virulence.

De plus, une population présentant un profil de virulence complexe peut correspondre à un mélange de plusieurs individus avec des virulences différentes. Or, la présence d'un pathotype avirulent peut entraîner la résistance de plante normalement sensible à un pathotype virulent lui aussi présent. L'obtention de souches monozoosporanges pourra lever le doute sur un éventuel mélange de pathotypes chez une souche présentant un nouveau profil de virulence.

Dans la littérature, une méthode d'obtention de souches monospores a été décrite (Spring et *al.*, 1998), sa mise en œuvre au sein du laboratoire ne nous a pas permis d'obtenir des souches monospores. Nous avons donc envisagé de développer une nouvelle méthode nous permettant d'obtenir dans nos conditions expérimentales des souches monozoosporanges.

Ces résultats font l'objet d'une publication dans « Cryptogamie, Mycologie »

A new method to obtain monozoosporangial isolates of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*)

Nachaat SAKR ^a, Mireille DUCHER ^b, Jeanne TOURVIEILLE ^c,
Pascal WALSER ^c, Denis TOURVIEILLE de LABROUHE ^c

^aDepartment of Agriculture, Syrien Atomic Energie Commission,
Damascus P.O. Box 6091,
present address : INRA-UBP, UMR 1095 Amélioration et Santé des plantes,
234 Avenue du Brézet F-63100 Clermont-Ferrand
(E-mail : nsakr@sancy.clermont.inra.fr)

^bUBP- INRA, UMR 1095 Amélioration et Santé des plantes,
234 Avenue des Landais F-63177 Clermont-Ferrand,

^cINRA-UBP, UMR 1095 Amélioration et Santé des plantes,
234 Avenue du Brézet F-63100 Clermont-Ferrand

Summary - A new method to obtain monozoosporangial strains was applied on 9 pathotypes of *Plasmopara halstedii* (100, 300, 304, 314, 700, 704, 710, 707 and 714), the parasite causing sunflower downy mildew. Single zoosporangia were isolated from the surface of agar medium and placed on leaf disks on solid Knop medium. The best fungal development was obtained with leaf disks taken from the first pair of sunflower leaves when these measured from 5 to 8cm in length. The percentage success rate in obtaining monozoosporangial strains varied from 1.4 to 7.4% according to race. The percentage of disks showing sporulation depends on spore viability, the physiological state of leaves and the receptivity of the sunflower genotype. This method enabled us to confirm the presence of a new downy mildew pathotype in France: race 707.

***Plasmopara halstedii* / monozoosporangial strain / leaf disk / sunflower / race / isolate**

Résumé - Une nouvelle méthode pour obtenir des souches monozoosporanges a été appliquée sur neuf profils de virulence (100, 300, 304, 314, 700, 704, 710, 707 et 714) de *Plasmopara halstedii*, l'agent du mildiou de tournesol. Un seul zoosporange a été isolé à la surface d'un milieu gélosé et déposé sur un disque foliaire placé sur milieu de Knop gélosé. Un meilleur taux de réussite a été obtenu avec des disques foliaires prélevés sur la première paire de feuille lorsqu'elles atteignent 5 à 8 cm. Le taux de souches monosporanges obtenu varie de 1,4 à 7,4 % selon les pathotypes. Le pourcentage de disques sporulés dépend de la viabilité des zoosporanges, de l'état physiologique des feuilles et la réceptivité de génotype du tournesol. Cette méthode nous a permis de confirmer la présence d'un nouveau pathotype sur le territoire français : race 707.

***Plasmopara halstedii* / monozoosporanges / disque foliaire / tournesol / race / isolement**

INTRODUCTION

Sunflower downy mildew is a common disease in many regions where sunflowers (*Helianthus annuus* L.) are grown. The pathogen, *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berles & de Toni, is an obligate parasite. The disease affects young plants when the water content of the soil is high and the maximum temperature is between 15 and 18°C. *P. halstedii* is an Oomycete with asexual multiplication by liberation of zoosporangia produced on the under surfaces of sunflower leaves and sexual reproduction giving oospores which are found in crop residues.

P. halstedii shows physiological races (pathotypes) capable of infecting a variable range of sunflower genotypes. The nomenclature of these races is based on the reaction of a series of differential lines (Tourvieille de Labrouhe, 1999). In France, race 100 (European race) has been present in the sunflower crop since 1965. Until 1987, it was the only race identified but in 1988 and 1989, two new races, 710 and 703 appeared (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 1991). Since then, prospecting each year have demonstrated the existence in France of 3 races in 1993, 5 races in 1994, 6 in 2000, 9 in 2002 and 12 in 2004 (Tourvieille de Labrouhe, 2004). The 6 races identified since 2000 (304, 307, 314, 334, 704 and 714) and purified on specific host differentials had not been described previously in other countries. They appear to result from evolution of the parasite in France.

There are two main reasons why it was useful to obtain monozosporangial strains of downy mildew. The first is to permit studies of the variability within or between races. A pathotype is generally a population made up of a certain number of fungal genotypes which have in common the same virulence profile. The second use is to demonstrate different pathotypes within a single isolate. An isolate of a pathogen with a complex virulence profile can be a stable mixture of several populations with different virulences and the resistance resulting from the presence of one avirulent pathotype could lead to resistance of the plant host to a virulent strain present in the mixture. An example is provided by an isolate collected in 2004 which showed a new virulence profile: 707. In spite of resistance tests on 29 inbred sunflower lines and 105 hybrid varieties (unpublished data), it had not been possible to determine whether this isolate was truly a new pathotype or whether it was a mixture of several different races.

Research to obtain monospore strains has already been carried out on several pathogen species. For example, Alves-Santos *et al.* (2002) used monoconidial cultures of *Fusarium oxysporium* f. sp. *phaseoli*, which cause haricot bean wilt, to characterise aggressiveness and physiological race specialisation of 11 isolates. Okori *et al.* (2004) studied the variability between isolates of *Cercospora zea-maydis*, which causes grey leaf rot of maize, also using monoconidial isolates. For the Oomycete, *Phytophthora infestans*, the pathogen of late blight of potatoes, Oliva *et al.* (2002) used monospore cultures to study the characteristics of sexual reproduction. All these reports concern fungi that can easily be multiplied on artificial media. Concerning obligate parasites, Maisonneuve (personal comm.) obtained monospore isolates of *Bremia lactuca*, lettuce downy mildew, after isolation of single spores and deposit on the under surface of young cotyledons (the first pair of leaves just visible) of the variety Cobham-Green, which does not carry any resistance genes. Grief (personal comm.) obtained monozosporangial strains of *Plasmopara viticola*, vine downy mildew, by isolating single zoosporangia which were placed on the lower surface of young leaves (4-5 leaf stage) of a very susceptible variety.

Method to obtain monozoosporangial strains of *P. halstedii*

For sunflower downy mildew, Sackston & Vimard (1988) proposed a method to infect leaf disks: 20 µl of inoculum containing 50 000 zoosporangia per disk, placed on damp blotting paper in Petri dishes. Spring *et al.* (1998) developed a method to produce monozoospore strains. They isolated single zoospores by means of a microlitre syringe and placed them on leaf disks from plants multiplied in a cabinet at 16 °C, 80% RH, and 14h photo period. They incubated them in microplates which were kept in the same conditions. We were not able to reproduce these results in our laboratory, so a new isolation method has been developed to isolate single zoosporangia which are used to infect leaf disks to obtain monozoosporangial strains. We used 9 different strains of *P.halstedii* to determine the percentage of sporulated disks with French downy mildew pathotypes and leaf disks from young plants grown in a greenhouse (under natural light conditions).

MATERIAL

Fungal isolates: All the strains of *P.halstedii* (table 1) used in this study were collected in France and maintained at INRA, Clermont–Ferrand. The manipulation of this quarantine parasite respected European regulations (No 2003/DRAF/70). Race 100 was isolated in 1966, race 710 in 1988, race 703 in 1889, and race 700 in 1995. Race 707 was isolated in 2004 by the Plant Protection Service during its annual downy mildew survey. The other isolates, DU 1842, DU 1767, DU 1650, DU 1734 and DU 1915 were obtained after 5 years of sunflower mono-culture under insect proof cages infected with races 100 (MIL 001) and 710 (MIL 002). These isolates were characterised for their virulence patterns and were found to be isolates of races 300, 304, 314, 704 and 714 respectively.

Sunflower genotypes: The open pollinated variety Peredovik, of Russian origin and not carrying any known resistance gene was used to produce leaf discs. The virulence profiles of the *P.halstedii* isolates were determined with the 9 differential inbred sunflower lines which give the international nomenclature of sunflower downy mildew races (Tourvieille de Labrouhe, 1999).

Table 1- List of *Plasmopara halstedii* isolates used in the present study.

Reference	Race	Geographical	Year	Collection
		origin	isolated	
MIL 001	100	France	1966	INRA-CL
DU 1842	300	France	2005	INRA-CL
DU 1767	304	France	2005	INRA-CL
DU 1650	314	France	2005	INRA-CL
MIL 005	700	France	1995	INRA-CL
DU 1734	704	France	2005	INRA-CL
MIL 015	707	France	2004	INRA-CL
MIL 002	710	France	1988	INRA-CL
DU1915	714	France	2005	INRA-CL

INRA-CL = Institut National de la Recherche Agronomique – Clermont-Ferrand - France

METHODS

Isolate conservation: for long term conservation (Molinero-Demilly *et al.*, 2005), the cotyledons of infected seedlings showing a large amount of sporulation was placed in a desiccator containing anhydrous CaCl₂ (RH 35%), at 20°C for 24h (30h is a maximum). The dried cotyledons were then placed in a container and frozen at -80°C without any particular precautions.

Characterisation of virulence: the *P.halstedii* isolates were multiplied on a susceptible sunflower variety and then used to infect the 9 differential inbred lines D1 to D9, using the methodology described by Tourvieille de Labrouhe (1999).

Measurement of zoosporangia size: The suspension of zoosporangia was obtained by placing a sporulated cotyledon in 5 ml of physiological serum. The size of 100 zoosporangia per isolate was measured under a light microscope (magnification X400). The area of the zoospores was calculated from an ellipsoid $\pi \times a \times b$, $a = \frac{1}{2}$ length, $b = \frac{1}{2}$ width.

Production of monozoosporangial isolates:

Preparation of leaf discs:

Seed germination: The sunflower seeds were disinfected with 12% NaOCl solution for 3 minutes, washed with permuted water and placed in Petri dishes containing damp filter paper. They were left to germinate at 20 °C in the dark for 48h.

Sowing germinated seed: the germinated seed with 0.5cm radicals were sown in 7cm pots containing 60% light peat and 40% dark peat (4 seeds per pot). No nutrients were provided. The pots were maintained in a greenhouse at 18-25 °C, RH 50 to 90 % and natural light.

Preparation of leaf disks: Leaf disks were cut from the first pair of leaves when they are 5 to 8cm in length. The leaves were rinsed twice in sterile water to reduce microbial infection. The disks were cut with a 9.1 mm cutter and were placed in 9cm diameter Petri dishes with the lower surface in contact with solid Knop medium (15g agar, 0.5g Ca (NO₃)₂, 4H₂O, 0.125g MgSO₄, 7H₂O, 0.125g KNO₃ and 0.125g KH₂PO₄ / 1L of permuted water), with 6 disks in each dish.

Preparation of the zoosporangia suspension: Inoculum was obtained from infected seedlings of the susceptible variety Peredovik, inoculated by the method of Cohen & Sackston (1973), which, after 12 days incubation, were placed in conditions of saturated humidity for 48h. Each sporulated cotyledon was placed in a tube containing 10 ml of physiological serum (9g NaCl + 1L permuted water) and shaken. One hundred microlitres of suspension was spread on Petri dishes on the surface of an agar medium (12g agar / 1L permuted water).

Isolation of zoosporangia: The zoosporangia were collected individually under a reverse microscope (x200) with the cone of a micro-pipette (10 µL) and then placed on a leaf disk in a drop (30 µL) of permuted water.

Incubation of leaf disks: The Petri dishes containing the disks were incubated in a growth chamber (18h light, 16-20 °C and 50-60 % RH). They were observed every day.

Infection of a germinated seed with a sporulated leaf disk: The disks which developed sporulation were placed individually in an Eppendorf tube with 1ml of permuted water and one germinated sunflower seed of the variety Peredovik for 4h. This seed was then planted in a 7cm diameter pot containing soil-less compost, and maintained in a growth

Methode to obtain monozoosporangial strains of *P. halstedii*

chamber at 18°C, RH 65-90% and a light intensity of 12000 lux [fluorescent tubes Philips 36 W super 80 new generation G 13 (Tourvieille de Labrouche *et al.*, 1988)]. After 14 days incubation, the spores obtained from the infected seedlings could be considered as monozoosporangial isolates. Such isolates were then multiplied on further Peredovik seedlings using the method of Cohen & Sackston (1973).

RESULTS

Production of monozoosporangial isolates: The mean percentage of leaf disks showing sporulation was low (Figure 1), it varied from 3.4% for isolate DU1842 (profile 300) to 12.2% for isolate DU 1734 (profile 704). All the results are presented in Table 2. For all the isolates, the first appearance of symptoms was 5 to 12 days after leaf disk infection.

The proportion of monozoosporangial strains that it was possible to multiply up and maintain varied from 35.8 % for isolate MIL 001 (race 100) to 100 % for isolate DU 1915 (profile 714) (table 2). The overall percentage of monozoosporangial strains produced from leaf disk infection varied from 1.4 to 7.4 %.



Fig. 1. Sporulation on a sunflower leaf disc, 10 days after infection by a single *Plasmopara halstedii* zoosporangium.

Table 2- Percentages of monozoosporangial strains obtained after infection of sunflower leaf discs by single zoosporangia of different *P.halstedii* pathotypes.

Reference	Race	Nb disks infected	Nb disks sporulated	% of disks sporulated	Nb isolates Multiplied	% of isolates maintained	% of infections giving monozoosporangial strains
MIL 001	100	741	28	3.8	10	35.7	1.4
DU 1842	300	350	12	3.4	9	75.0	2.8
DU 1767	304	402	27	6.3	19	70.4	4.7
DU 1650	314	312	16	5.1	11	68.8	3.5
MIL 005	700	240	15	6.3	11	73.3	4.6
DU 1734	704	312	38	12.2	23	60.5	7.4
MIL 015	707	432	18	4.2	15	83.3	3.5
MIL 002	710	405	21	5.2	19	90.5	4.7
DU1915	714	108	6	5.6	6	100.0	5.6

Characterisation of the virulence profile of monozoosporangial strains: The virulence profiles of monozoosporangial strain obtained from isolate MIL015 are presented in table 3. They all show the same profile (707) as the original isolate, MIL 015.

Analysis of zoosporangium size for the monozoosporangial strains of race 707: Figure 2 shows that there was some variation between the different monozoosporangial strains isolated from MIL 0015: $M1 = 304.4 \mu^2 \pm 15.5$, $M2 = 464.3 \mu^2 \pm 54.6$. However, this intra-pathotype diversity was less than that between isolates of different races: $251.9 \mu^2 \pm 11.1$ for race 304 (DU 1767) and $555.5 \mu^2 \pm 60.5$ for race 714 (DU 1915). The mean for the 15 monozoosporangial strains, $392.5 \mu^2 \pm 22.8$, was not significantly different from the mean size of zoosporangia produced by the original isolate MIL 015: $375.1 \mu^2 \pm 31.9$.

Figure 2: Size of zoosporangia of different *Plasmopara halstedii* isolates (♦) and 15 (M1-M15) monozoosporangial strains (x) obtained from isolate MIL 015 (race 707). Mean of 100 zoosporangia.

Table 3- Characterisation of virulence profiles* of monozoosporangial strains M1 to M15, obtained from the *Plasmopara halstedii* isolate MIL015 on differential sunflower lines.

Isolate \ Differential lines	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	Virulence profile
MIL015	S	S	S	R	R	R	S	S	S	707
M1 to M15	S	S	S	R	R	R	S	S	S	707

* Tourvieille de Labrouhe (1999). S: Sensible. R: Resistant.

DISCUSSION

The method presented enabled us to obtain monozoosporangial strains of 9 French races of *Plasmopara halstedii* (100, 300, 304, 314, 700, 704, 710, 707 and 714). The rates of production of sporulating leaf disks were not very high (from 3.4% to 12.2%), but they were

Method to obtain monozoosporangial strains of *P. halstedii*

similar to those reported by Spring *et al.* (1998) for the same parasite and by Maisonneuve (personal comm.) with *B. lactica*. Spring *et al.* (1998) reported that 5% of leaf disks were infected by a single zoospore and 15% by the zoospores from single zoosporangia. Maisonneuve (personal comm.) obtained, on average, less than one cotyledon sporulated per Petri dish containing 16 to 24 cotyledons, after 10 to 12 days incubation with 16/24h light, 16°C at day and 12°C at night. In contrast, Grief (personal comm.) obtained 30-40% success with *P. viticola*, after only 5 days incubation with 16h light, 22 °C and 100% RH.

Spring *et al.* (1998) reported that the proportion of sporulating leaf disks from which it was possible to maintain a strain was 70% for disks infected with a single zoospore and 80% for discs infected by the zoospores from one zoosporangium. In the case of lettuce downy mildew, Maisonneuve (personal comm.) obtained 100% success 10 days after inoculation with a sporulating cotyledon and Grief (personal comm.) obtained the same result with *P. viticola*. The number of leaf disks which sporulate appears to depend on 3 factors:

Zoosporangia viability: the zoosporangia used for leaf disk infection showed large differences in size: from 14.4 x 12.0 µ to 81.6 × 33.6 µ but it was not possible to define whether all were mature. Meliala (2001) showed that, in general one in three zoosporangia is viable, but this proportion varies between isolates.

The use of physiological serum (NaCl 9%) prolongs the life of zoospores within the zoosporangia by considerably slowing their maturation and thus their liberation. Distribution of 100µl of suspension over the surface of agar medium in 9cm Petri dishes makes it quite easy to isolate the number of zoosporangia required for an experiment. However, the zoosporangia need to be separated on the agar and covered with a thin film of water. If there is too much water, or too high concentration of zoosporangia, it is impossible to be sure that only one zoosporangia is placed on each leaf disk.

The physiological state of the sunflower leaves: From which the leaf disks were obtained: observations on plants grown in the greenhouse showed that their conditions of growth affected percentage success of monozoosporangial strain production. *P. halstedii* cannot be maintained on an artificial medium, the Knop medium was used only to improve survival of the sunflower leaf disks. All the sporulating disks came from the first pair of leaves when these measured from 5 to 8cm in length. Disks from cotyledons or second or third pair of leaves were experimented, but they gave no sporulation. In addition, leaf disks taken from the first pair of leaves on plants grown under high light conditions (spring, summer) give much better results than those from plants grown under poor light (autumn, winter). This is in contrast to Spring *et al.* (1998), who considered that the physiological state of plants was not a factor important in the success of production of monozoosporangial strains. They found that the cotyledons and first leaves of plants aged 14 days, grown in growth chambers at 16 °C, 80% RH and 14h light gave the best results, but in our growth chambers, such conditions did not lead to any sporulating leaf disks. It could be that high light intensity, giving increased photosynthesis, leads to a higher concentration of nutriment in leaves when the disks are cut, which would be favourable for fungal growth.

For the leaf disks in Petri dishes, the growth chamber conditions (16-20 °C, 50-60% RH and 18h light), produce a very thin film of water on the inside of the Petri dish cover and this appears to give the best micro-climate for downy mildew sporulation on the leaf disks.

Sunflower genotype and *P.halstedii* isolate: The open pollinated variety Peredovik carries no known downy mildew resistance gene but, since it is a population, the plants are not identical. Since the variety shows some partial race non-specific resistance, it is possible that leaf disks from some plants were not very receptive to infection by downy mildew zoospores. This could explain why the levels of infection reported here were not very high. They might be increased if a sunflower genotype with less partial non-specific resistance was used.

In our experiments, the variation in success rate (from 35.7% to 100.0 %) may also have been due to differences in the fitness of the different *P.halstedii* isolates. Our observations confirm that there is considerable diversity between monozosporangial strains for size of zoosporangia. An isolate from the field appears to be a population with some characteristics, such as virulence, in common but others which vary, for example the number of zoospores produced by the zoosporangia, which in turn appears to depend on the size of the latter (Delanoe, 1972). Such characters can be considered to intervene in the fitness of a strain to multiply and become dominant. In our laboratory, studies are in progress on the variability concerning fitness of a range of sunflower downy mildew strains.

Production of monozosporangial strains is a good method to identify and purify a new race. Inoculum collected from plants in the field is made up of thousands of zoosporangia which may come from several different strains or races which infected the same plant. Purification of a race is straightforward if a sunflower genotype with specific susceptibility to the race is available, but if this is not the case, there will always be a doubt. This is particularly true since an avirulent strain in the mixture can cause a defence reaction in the plant which limits or even halts infection by a virulent strain. The production of monozosporangial strains removes these uncertainties. For example, the monozosporangial strains confirmed the presence of race 707 in France.

Acknowledgments. We gratefully acknowledge F.VEAR for critical reading and translation of this manuscript.

REFERENCES

ALVES-SANTOS F.M., CORDEIRO-RODRIGUES L., SAYAGUES J.M., MARTIN-DOMINGUEZ R., GARCIA-BENAVIDES P., CRESPO M.C., DIAZ-MINGUEZ J.M. & ESLAVA A.B., 2002 - Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporium* f. sp. *Phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant pathology*, 51: 605-611.

COHEN Y. & SACKSTON W.E., 1973 - Factors affecting infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany* 51: 15-22.

DELANOE D., 1972 - Biologie et épidémiologie du mildiou du tournesol (*Plasmopara helianthi* Novot.). *Information Technique CETIOM* 29: 1-47.

MELIALA C., 2001 - Biologie du *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni, agent du mildiou du tournesol (*Helianthus annuus* L.). Thèse de l'université Blaise Pascal (Clermont Ferrand), N° D.U. 1266, 149 p.

MOLINERO-DEMILLY V., WALSER P., GIROULT C., HERBERT O., GUENARD M. & TOURVIEILLE de LABROUHE D., 2005 - Mise au point d'une méthode de conservation à long terme de *Plasmopara halstedii*, parasite obligatoire, agent du mildiou du tournesol. *Cryptogamie, Mycologie* 26: 189-194.

OKORI P., RUBAIHAYO P.R., ADIPALA E. & DIXELIUS C., 2004 - Interactive effects of host, pathogen and mineral nutrition on grey leaf spot epidemics in Uganda. *European Journal of plant pathology* 110: 119-128.

Methode to obtain monozoosporangial strains of *P. halstedii*

OLIVA R.F., ERSELIUS L.J., ADLER N.E. & FORBES G.A., 2002 - Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans sensus lato* in Ecuador. *Plant pathology* 51: 710-719.

SACKSTON W.E. & VIMARD B., 1988 - Leaf disc immersion (LDI) inoculation of sunflower with *Plasmopara halstedii* for *in vitro* determination of host-pathogen relationships. *Plant disease* 72: 227-229.

SPRING O., OZYNEK B. & ZIPPER R., 1998 - Single Spore Infection with Sunflower Downy mildew. *Journal Phytopathology* 146: 577-579.

TOURVIEILLE de LABROUHE D., CHAMPION R., VEAR F., MOUZEYAR S. & SAID J., 1988 - Une nouvelle race de mildiou en France. Identification, test et control. *Informations Techniques CETIOM* 104: 3-9.

TOURVIEILLE de LABROUHE D., MOUZEYAR S., LAFON S. & REGNAULT Y., 1991- Evolution des races de mildiou (*Plasmopara halstedii*) sur tournesol, en France. 3^e Conférence internationale sur les maladies des plantes. 3-5 décembre, Bordeaux (France): 777-784.

TOURVIEILLE de LABROUHE D., 1999 - La nouvelle nomenclature des races de *Plasmopara halstedii*, agent du mildiou du tournesol, appliquée aux races françaises. *Oléagineux Corps gras Lipides*. 6: 219-22.

TOURVIEILLE de LABROUHE D., 2004 - Faire durer la résistance au mildiou du tournesol. *Rencontre Annuelles du CETIOM*. 30 novembre-1 décembre, Paris (France): 67-73.

BILAN

Le pourcentage de disques foliaires sporulés varie selon les souches de 3,43 à 12,18 %. Cette variation qui est probablement due à des différences du taux de viabilité de zoosporanges, à l'état physiologique des feuilles ayant servi au prélèvement des disques foliaires et à la réceptivité du génotype du tournesol. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la capacité d'un seul zoosporange à infecter un disque foliaire soit dépendante des souches du parasite. Ce facteur de variabilité pourrait être lié à la « fitness » du parasite, cependant la lourdeur du dispositif expérimental ne nous permet pas d'envisager son exploitation de façon plus systématique.

Dans les conditions climatiques de la serre et dans la chambre de culture, nous avons pu développer une méthode pour obtenir un nombre suffisant d'isolats monozoosporanges afin de réaliser les tests biologiques liés à l'agressivité. Ainsi nous avons obtenu :

- 10 isolats monospores de la souche MIL 001 (race 100)
- 9 isolats monospores de la souche DU 1842 (race 300)
- 19 isolats monospores de la souche DU 1767 (race 304)
- 11 isolats monospores de la souche DU 1650 (race 314)
- 11 isolats monospores de la souche MIL 005 (race 700)
- 23 isolats monospores de la souche DU 1734 (race 704)
- 15 isolats monospores de la souche MIL 015 (race 707)
- 19 isolats monospores de la souche MIL 002 (race 710)
- 6 isolats monospores de la souche DU 1915 (race 714)

Malheureusement, de nombreuses souches n'ont pas redonné de culture après cryoconservation, peut-être à cause d'une résistance moindre de ces souches clonées. Cependant, il nous a été possible de travailler avec 35 isolats appartenant à 7 pathotypes (5 isolats par pathotype) :

MIL 001(race 100), MIL 002 (race 710), DU 1842 (race 300), DU 1915 (race 714), DU 1734 (race 704), DU 1767 (race 304) et DU 1943 (race 314).

Article 2

Mise au point d'une méthode pour mesurer l'agressivité chez *Plasmopara halstedii*

L'objectif de ce chapitre sera de définir des paramètres simples qui permettront de mesurer l'agressivité des souches de *Plasmopara halstedii*. Ces critères pourraient être utilisés par les sélectionneurs pour évaluer le comportement de nouvelles variétés de tournesol face à *P. halstedii*.

La composante qualitative du pouvoir pathogène (virulence) est bien analysée dans plusieurs études (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). Cependant, la caractérisation de la composante quantitative (agressivité) n'a pas fait l'objet de publication. Il n'existe donc pas de méthode décrite pour la quantifier chez les souches de *Plasmopara halstedii*. Comme ce parasite est un biotrophe strict, l'étude des facteurs d'agressivité ne peut être envisagée qu'en coculture avec sa plante-hôte. Nous avons donc développé un protocole permettant d'estimer des critères d'agressivité liés au processus infectieux. Notre choix s'est porté sur des critères largement étudiés dans plusieurs pathosystèmes (Miller *et al.*, 1998 ; Bonde *et al.*, 2006) :

- **La durée de latence** : C'est la durée de la période qui sépare l'infection de l'apparition des premières sporulations sur les organes du végétal.

Après 7 jours de culture et 24 heures d'humidité saturante, chez les génotypes de tournesol très sensibles infectés par les souches les plus agressives, de nombreuses plantules présentent déjà une sporulation importante. Afin de pouvoir comparer toutes les souches sur tous les génotypes de tournesol, nous avons retenu comme critère discriminant la durée d'incubation nécessaire pour obtenir 80 % de plantes présentant une sporulation.

- **La densité de sporulation** : C'est un facteur important de la dissémination du parasite qui peut, également, exprimer le niveau d'invasion des tissus des plantes infectées par un parasite biotrophe.

Cette densité augmente avec la durée d'incubation. Deux approches étaient envisageables 1) la mesure de l'aire sous la courbe de la densité en fonction du temps qui nécessitait de répéter les mesures à chaque durée d'incubation, 2) la prise en compte de la densité maximum de sporulation mesurée avant que les cotylédons pourrissent. La diversité de taille des zoosporanges (voir article 3) nous obligeant à réaliser des comptages visuels en microscopie optique, nous avons choisi la deuxième approche.

Enfin, pour nous assurer que le comportement d'une souche n'est pas spécifique à un génotype de tournesol donné, nous avons réalisé les expérimentations sur plusieurs lignées dépourvues de gène *Pl* de résistance et connues pour avoir des comportements assez différents lors d'infections naturelles.

Ces résultats font l'objet d'une publication (sous presse) à « Journal of Phytopathology »

**A method to measure aggressiveness of *Plasmopara halstedii*
(sunflower downy mildew)**

Nachaat Sakr¹⁻², Mireille Ducher²⁻¹, Jeanne Tourvieille²⁻¹, Pascal Walser¹⁻², Félicity Vear¹⁻² and Denis Tourvieille de Labrouhe¹⁻² (*)

¹⁻²INRA, UMR 1095, 234 Avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France

²⁻¹UBP, UMR 1095, 24 Avenue des Landais, 63177 Clermont-Ferrand, France

(*) Author for correspondence✉: Fax: +33 (0)473 624 445; E-mail: tourvie@clermont.inra.fr

Abstract

For the first time, a method was used to measure aggressiveness of two *Plasmopara halstedii* races (100 and 710), the parasite causing sunflower downy mildew. Two sunflower lines showing different levels of quantitative resistance were used to measure two aggressiveness criteria: latent period and sporulation density. A strain of race 100 had a shorter latent period and greater sporulation density than a strain of race 710. The sunflower inbred line BT, rather susceptible in the field, presented a greater sporulation density and a shorter latent period than another inbred line FU, which shows greater resistance in the field. These results indicated that race 100 was more aggressive than race 710. The behaviour in the field of the two inbred lines was confirmed in the laboratory observations.

Key words: latent period, obligate parasite, race, sporulation density

Introduction

Sunflower downy mildew is a common disease in many regions where sunflowers (*Helianthus annuus* L.) are grown. The pathogen, *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berles & de Toni, is an obligate parasite. *P. halstedii* shows physiological races (pathotypes) capable of infecting a variable range of sunflower genotypes. The nomenclature of these races is based on the reaction of a series of differential lines (Tourvieille de Labrouhe 1999). To date, at least 35 different pathotypes have been described in different parts of the world (Gulya 2007). There have been several studies on virulence (specific disease – causing abilities) but no publications have reported on aggressiveness (non-specific disease – causing abilities) according to Van der Plank (1968). This author postulated that disease resistance in plants can be classed in one of two categories 1- vertical resistance (race specific, qualitative resistance) which is conferred by major specific genes and tends to produce a disease-free plant and 2- horizontal resistance (partial, field, non race specific, or quantitative resistance) which is controlled by minor genes and tends to impact the rate of disease development (rate reducing) rather than produce a disease-free plant.

It appears possible that wide usage of sunflower varieties presenting high levels of quantitative resistance could lead to increases in aggressiveness in *P. halstedii* as observed for the pathosystem *Mycosphaerella graminicola* / *Triticum aestivum* (Cowger and Mundt 2002), so it is important to be able to measure this character. However, up till now, no method to measure aggressiveness has been described for *P. halstedii*. The method proposed by Cohen and Sackston (1973) to obtain zoosporangia has been used by breeders to determine major gene resistance against downy mildew, giving plants that were considered as free of disease.

This paper describes a method to measure aggressiveness of *P. halstedii*, according to criteria such as latent period and sporulation density (Miller et al. 1998) widely used in studies on other parasites. Two sunflower inbred lines carrying different levels of quantitative resistance (Vear et al. 2007; Tourvieille de Labrouhe et al. 2008) were used to analyse aggressiveness in strains of races 100 and 710.

Material and methods

Fungal strains

The *P. halstedii* strains used in this study were collected in France and maintained at INRA, Clermont–Ferrand. Manipulation of this quarantine parasite respected European regulations (No 2003/DRAF/70). Strain MIL 001 (race 100) was isolated in 1966 and strain MIL 002 (710) in 1988. Their virulence characteristics were defined by Tourvieille de Labrouhe (1999). The two strains were multiplied on the same sunflower genotype in the same conditions, such that any original intra-strain variability would be maintained to the same extent for the two strains. In addition, the strains are multiplied using their zoospores, which could be a continued source of new variability, even for originally monozosporangial isolates.

Sunflower genotypes

To characterise aggressiveness of *P. halstedii* strains, two INRA inbred lines carrying no *Pl* gene and known to have different levels of quantitative resistance (Vear et al. 2007; Tourvieille de Labrouhe et al. 2008) were studied: FU, which has greater resistance in the field and BT, rather susceptible in the field.

Test conditions

All the tests were carried out in growth chambers regulated at 18h light, 18 °C ± 1 and RH of 65 - 90%. Germinating seed with radicals of 5-10 mm were infected with fresh suspensions of zoosporangia obtained from diseased seedlings of the open pollinated variety Peredovik (susceptible to all known races of *P. halstedii*) maintained for 48 hours at 100% RH. Infection was obtained by soaking the seeds for 3h in a suspension of 1x10⁵ zoosporangia per ml, counted

with a Malassez cell (Tourvieille de Labrouhe et al. 2000). The seedlings were grown in soil-less horticultural compost.

Measurement of aggressiveness

Aggressiveness was measured by length of latent period and sporulation density.

Latent period: This was defined as the number of days incubation necessary to obtain 80% sporulating plants. For measurement, 6 treatments were carried out: sixty infected germinating seeds were planted out in 6 pots (10 seeds per pot). Each day, after incubation for 7 to 12 days, one pot was covered with a polythene bag. After 24 hours at 100%RH, the number of seedlings in the pot showing sporulation on the shoot was noted, with a +/- reading. These observations were combined to give the number of plants expressing symptoms after 13 days incubation, which enabled calculation of the percentage of diseased plants expressing symptoms for each incubation period compared with the total after 13 days. The latent period was read from a quadratic regression curve drawn from percent plants sporulating, including the intermediate points and the first day when 100% sporulation was obtained. For each strain, the experiment was made once, with three replications.

Sporulation density: This was defined as the number of zoosporangia produced by a cotyledon. For measurement, the cotyledons of seedlings showing sporulation after a given incubation period, were grouped together in a small container. Two ml of physiological water (9g NaCl / 1L permuted water) [which slowed zoosporangia maturation to make easier observations before liberation of zoospores (Tourvieille de Labrouhe et al. 2000)] per seedling were added and the whole vigorously shaken before counting (18 observations per sample) under an optical microscope with a Malassez cell. The statistical analyses concerned concentrations measured after 12 and 13 days incubation, which corresponded to the maximum quantity of zoosporangia produced by a cotyledon.

Statistical analyses

All statistical analyses of the aggressiveness data were performed using StatBox 6.7® (GimmerSoft) software. A complete randomised design with two factors (*P. halstedii* strain and sunflower genotype) and 3 replications was used for analysis of latent period. A randomized complete block design with two factors (*P. halstedii* strain and sunflower genotype) and 2 blocks corresponding to two incubation periods was used for analysis of sporulation density. The Newman-Keuls test (Snedecor and Gochran 1989) was used to compare the means at $P=0.05$.

Results

Rate of sporulation

Figure 1 shows that strain MIL 001 (race 100) sporulated after a shorter incubation period than strain MIL 002 (race 710) and that both races sporulated more rapidly on 'BT' than on 'FU'. In all cases, all infected plants showed 100% sporulation 13 days after incubation.

Quantity of zoosporangia produced

Figure 2 shows that the quantities of zoosporangia produced increased with time. Strain MIL 001 (race 100) produced more zoosporangia than strain MIL 002 (race 710) and both strains gave larger quantities of zoosporangia on 'BT' than on 'FU'. Their number was at a maximum 12 days after incubation.

Analysis of aggressiveness criteria

The results are presented in Table 1.

The mean latent period of strain MIL 001 (8.56 days) was significantly shorter than that of strain MIL 002 (9.51 days). This difference was observed on both inbred lines, but it was not significant for 'BT'. This line had, significantly shorter latent periods (mean 8.14 days) than FU (mean 9.32 days) for both strains.

On both inbred lines, strain MIL 001 produced significantly more zoosporangia than strain MIL 002: with means of 18.29×10^5 and 7.65×10^5 zoosporangia per cotyledon respectively. For strain MIL 001, host genotype was important since the quantity of zoosporangia produced on 'BT' was almost double that on 'FU'.

Discussion

Variability of virulence in *P. halstedii* has been the object of several studies (Tourvieille de Labrouhe 1999; Tourvieille de Labrouhe et al. 2000; Tourvieille de Labrouhe et al. 2005; Gulya 2007) because major monogenic resistances have been overcome rapidly by the parasite. Recently, breeders have become interested in the quantitative resistance which exists in cultivated sunflower (Vear et al. 2007; Tourvieille de Labrouhe et al. 2008). However, use of this type of resistance in breeding would require considerable effort so it will be useful only if it is durable and not overcome by development of downy mildew strains with increased aggressiveness. To estimate this risk, it was important to develop measurements of aggressiveness applicable on an obligate parasite and the method described in this article appears to be the first adapted to *P. halstedii*.

The number of zoosporangia produced by a diseased plant will determine the quantity of inoculum that can infect neighbouring plants, but is also indicative of the interaction between the host plant and the parasite, since the quantity of zoosporangia produced will depend on the

aggressiveness of parasite and the level of host quantitative resistance (Robinson 1976). The frequency of sporulated plants according to incubation period reflects the speed of appearance of symptoms on the plants (Fig. 1) (latent period) and the number of zoosporangia produced by cotyledons reflects the level of invasion of infected tissues (Fig. 2).

There are two constraints in this method: firstly, it is not possible to determine the time that separates infection from first sporulation, as at less than 7 days growth, the cotyledons can not always be separated from the hull without stressing the seedling, and from day 8, some strains already present very high levels of sporulation. However, the protocol seems adequate as it allows the length of the latent period to be calculated (based on 80% sporulation) for each strain. Secondly, observations cannot be maintained after 14 days incubation since some infected seedlings damp off and so stop sporulating.

Nevertheless, the two strains used in this study could be characterised. The results show that strain MIL 001 (race 100) is more aggressive than strain MIL 002 (race 710) for the two criteria used but, although not modifying the order of the two strains, expression of symptoms depends partly on host plant genotype.

It is interesting to note that the behaviour of two sunflower inbred lines agree with observations of natural field infections (Vear et al. 2007; Tourvieille de Labrouhe et al. 2008). It may be possible to use latent period and sporulation density to determine the level of quantitative resistance of sunflower genotypes. Such growth chamber tests would make it possible to confirm the non race specific character of resistance since, in contrast with field observations, it would be easy to analyse reaction of sunflower lines to many *P. halstedii* races.

In conclusion, the method used in this study detected significant differences between two *P. halstedii* strains with different virulence profiles. These differences observed on two strains which had not been subjected to selection pressure from quantitative resistance suggest that the evaluative potential of several races of *P. halstedii* should be determined. Since tools for analysing of obligate parasite Peronosporaceae are very limited (Spring and Thines 2004), it appears desirable to contain research for new methods.

Acknowledgements

We would like to thank the Syrian Commission of Energy Atomic for a Doctoral Scholarship concerning the first author. This study was carried out with the financial support of the French Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM) and of Ministry for Agriculture and Fishing (MAP) within the framework of the program CASDAR N° 391.

References

- Cohen Y, Sackston WE. (1973). Factors affecting infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. Canadian Journal of Botany **51**: 15-22
- Cowger C, Mundt CC. (2002). Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* Isolates from Suseptible and Partially Resistant Wheat Cultivars. Phytopathology **92**: 624-630
- Gulya TJ. (2007). Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. Advances in Downy Mildew Research. Vol. 3 Proceedings of the 2nd International Downy Mildew Symposium. Palcky University in Olomouc and JOLA, v.o.s., Kostelec na Hane (Czech Republic). pp. 135-142
- Miller JS, Johnson DA, Hamm PB. (1998). Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. Phytopathology **88**: 190-197
- Robinson RA. (1976). Plant Pathosystems. New York,USA, Academic press, 184 pp.
- Snedecor GW, Gochran WG. (1989). Statistical Methods. Iowa, USA, The Iwoa State University Press, 528 pp.
- Spring O, Thines M. (2004). On the necessity of new characters for classification and systematics of biotrophic Peronosporomycetes. Planta **219**: 910-914
- Tourvieille de Labrouhe D. (1999). La nouvelle nomenclature des races de *Plasmopara halstedii*, agent du mildiou du tournesol, appliquée aux races françaises. Oléagineux, Corps Gras, Lipides **6**: 219-222
- Tourvieille de Labrouhe D, Mestries E, Walser P. (2005). Quelles perspectives pour la lutte génétique vis-à-vis du mildiou du tournesol ? Oléagineux, Corps Gras, Lipides **12**: 85-93
- Tourvieille de Labrouhe D, Pilorge E, Nicolas P, Vear F. (2000). Le mildiou du tournesol. France, CETIOM, INRA Editions, 176 pp.
- Tourvieille de Labrouhe D, Serre F, Roche S, Walser P, Vear F. (2008). Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). Euphytica (in press)
- Van der Plank JE. Disease resistance in plants. (1968). New York and London, Academic press, 206 pp.
- Vear F, Serre F, Roche S, Walser P, Tourvieille de Labrouhe D. (2007). Recent research on downy mildew resistance useful for breeding industrial – use sunflowers. Helia **30**: 45-54

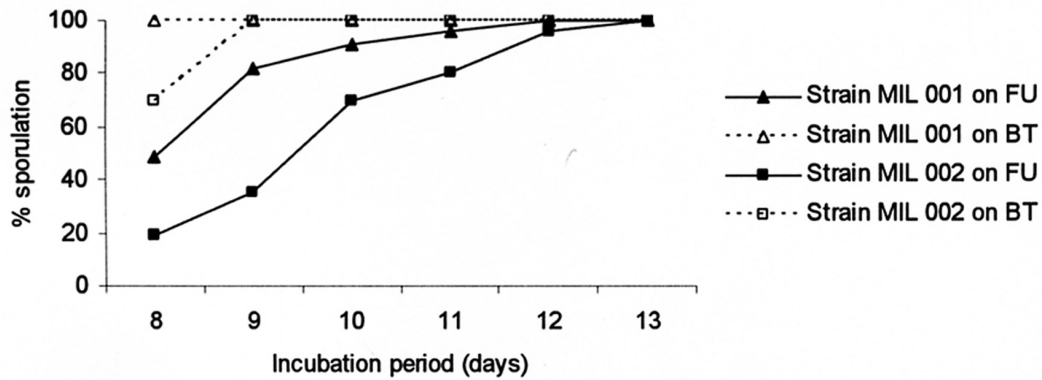


Figure 1: Appearance of sporulation for two *Plasmopara halstedii* strains on the sunflower inbred lines "FU" and "BT" according to incubation period.

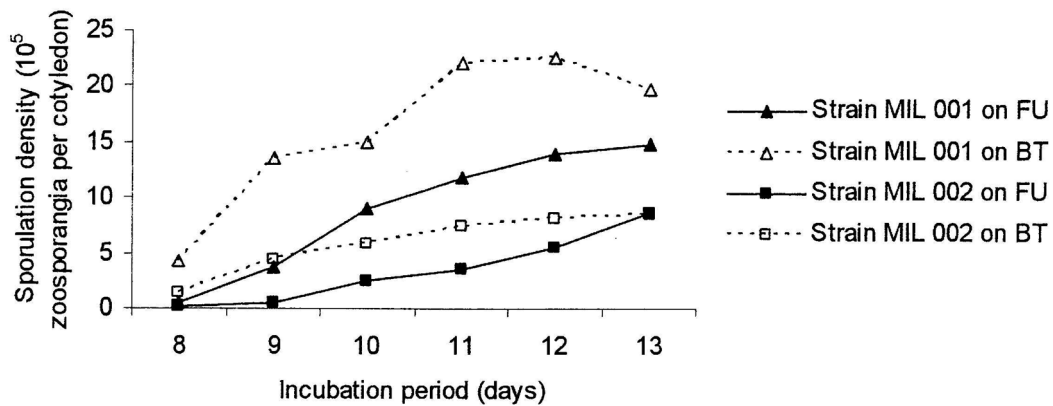


Figure 2: Density of sporulation for two *Plasmopara halstedii* strains on the sunflower inbred lines "FU" and "BT" according to incubation period.

Table 1: Responses of two sunflower inbred lines to two *Plasmopara halstedii* strains of virulence profiles 100 and 710.

Genotype / strain	Aggressiveness criteria			
	Latent period (days)		Sporulation density (zoosporangia per cotyledon)	
FU / strain MIL 001 (race 100)	9.12	b	14.32 10 ⁵	b
FU / strain MIL 002 (race 710)	10.75	a	7.03 10 ⁵	c
BT / strain MIL 001 (race 100)	8.00	c	22.25 10 ⁵	a
BT / strain MIL 002 (race 710)	8.28	c	8.26 10 ⁵	c

Values with the same letter are not significantly different according to Newman-Keul

BILAN

La méthode appliquée a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les deux souches utilisées MIL001 et MIL002. Les deux facteurs analysés sont corrélés : une durée de latence courte est associée à une densité de sporulation maximum élevée.

Le comportement des deux génotypes de tournesol « FU » (résistant » et « BT » (moyennement résistante) semble confirmer que les facteurs mesurés expriment bien l'agressivité des souches de *Plasmopara halstedii*. La souche MIL001 est plus agressive avec une durée de latence courte et une densité de sporulation élevée que la souche MIL002.

Nos résultats montrent qu'il est possible d'utiliser ces deux critères, **la durée de latence et la densité de sporulation**, pour caractériser l'agressivité d'un isolat de *P. halstedii*, mais également pour quantifier le niveau de résistance quantitative d'une lignée de tournesol.

Cette expérimentation nous permet également d'envisager de prendre en compte d'autres critères qui permettraient de compléter notre information sur l'agressivité, comme **le taux de réussite de l'infection et la réduction de longueur des hypocotyles**.

Article 3

Etude de la variabilité morphologique des zoosporanges de *Plasmopara halstedii*

Lors de l'étude de la variabilité d'une espèce fongique, les caractères morphologiques sont très souvent utilisés : aspect des thalles sur différents substrats, forme des organes de reproduction, etc. Pour un parasite biotrophe strict tel que *Plasmopara halstedii*, ces critères ne peuvent être pris en compte puisque l'essentiel du cycle biologique se déroule à l'intérieur des tissus de l'hôte. Pour ce pathogène, seuls les sporangiophores et les zoosporanges produits à la surface du végétal peuvent être caractérisés et utilisés. La forme des zoosporanges et leur taille ont été notées afin d'établir un éventuel lien entre les caractères morphologiques et le pouvoir pathogène (virulence et agressivité) des souches.

Nous nous sommes également intéressés à étudier l'impact des conditions de culture de *P. halstedii* sur les caractères morphologiques des zoosporanges analysés. Deux facteurs nous ont semblé importants : la durée d'incubation (délais entre infection et mise en place des conditions nécessaires à la sporulation) et le génotype de la plante hôte.

Une collection de 94 souches appartenant à 17 profils de virulence a été utilisée pour étudier les aspects morphologiques des zoosporanges, mais plus de 10 de ces profils ne sont représentés que par un seul échantillon. Pour cette raison, les études portant sur l'influence de l'âge des plantes hôtes ont été réalisées sur une collection de souches de profil 710 la plus représentée dans l'étude.

Ces résultats font l'objet d'une publication (sous presse) à « Mycological Progress »

Variation in form and size of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) zoosporangia

Nachaat Sakr¹, Mireille Ducher², Jeanne Tourvieille², Pascal Walser¹, Felicity Vear¹ and Denis Tourvieille de Labrouhe¹ (*)

¹INRA, UMR 1095, 234 Avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France

²Université Blaise Pascal, UMR 1095, 24 Avenue des Landais, 63177 Clermont-Ferrand, France

(*) Author for correspondence✉: Fax: +33 (0)4 73 62 44 45; E-mail: denis.tourvieille@clermont.inra.fr

Abstract

Zoosporangia form and size were studied on a collection of 94 strains of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). Both oval and round forms were present in all strains analysed. The proportion of two forms varied significantly according to strain and plant age but more especially to host plant genotype. Whatever strain or host genotype, oval zoosporangia were larger than round, but there was no relation between the proportion of the oval form and mean zoosporangia size. There was no relation between zoosporangia form or size and race virulence profiles or aggressiveness criteria, with the possible exception of zoosporangia size and sporulation density. It is concluded that, for this obligate parasite, although form and size of zoosporangia depend on pathogen strain, these characters vary also according to growth conditions of *Plasmopara halstedii*, in particular to the genotype of the plant host.

Key words: aggressiveness, *Helianthus annuus*, obligate parasite, virulence

Introduction

Important phytopathogenic Oomycetes include the genera *Bremia*, *Peronospora*, *Plasmopara* and *Sclerospora*. Characterisation of new phenotypic aspects in these obligate parasites is of interest for their taxonomy since morphological variability is limited (Spring and Thines 2004). Most of their life cycle takes place inside the host and only when disease symptoms carrying reproductive structures appear on the plant surface can morphological identification and analysis be easily carried out (Semal et al. 1989). With molecular techniques such as PCR methods, these pathogens can now be detected within hosts not showing symptoms (Ioos et al. 2007) and Göker et al. (2007) provided morphological characters for three distinct lineages revealed by molecular phylogenetic analyses. The genus *Plasmopara* was placed in a clade characterised by vesicular to pyriform haustoria. However, for *Plasmopara halstedii*, it has

not yet been possible to use molecular differences to define pathogenicity characteristics so it appeared useful to continue morphology studies (Spring et al. 2006; Delmotte et al. 2008).

Sunflower downy mildew is a common disease in many regions where sunflowers (*Helianthus annuus* L.) are grown. The pathogen, *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berles & de Toni, is an obligate parasite. Based on infection studies on *Helianthus* species and morphological and physiological characters of pathogen, Novotelnova (1966) identified three formae specialis: *P. halstedii* f. sp. *helianthi* which attacks only *Helianthus annuus* (sunflower), *P. halstedii* f. sp. *perennis* and *P. halstedii* f. sp. *patens* which infect perennial species. However, the distinction is now less clear since downy mildew resistance genes have been introduced from perennial species using resistance tests with *P. halstedii* isolates from cultivated sunflower (Seiler and Gulya, 2000).

The disease affects young plants when the water content of the soil is high and maximum temperature is between 15 and 18°C. *P. halstedii* shows asexual propagation by liberation of zoosporangia produced on the lower surfaces of sunflower leaves and sexual reproduction by oospores which are found in crop residues. *P. halstedii* shows physiological races (pathotypes) capable of infecting a variable range of sunflower genotypes. The nomenclature of these races is based on the reaction of a series of differential lines (Tourvieille de Labrouhe et al. 2000).

Zoosporangia play an important role in the life cycle because the zoospores they liberate are responsible for secondary infections (Tourvieille de Labrouhe et al. 2000). The quantity of zoosporangia produced by the parasite was used to estimate aggressiveness. Some authors identified the form and size of zoosporangia (Nishimura 1922; Delanoë 1972; Hall 1989; Spring et al. 2003), but there do not appear to have been any studies of the relationship between zoosporangia morphology and the two components of pathogenicity in *P. halstedii*: virulence (specific disease-causing abilities) and aggressiveness (non-specific disease-causing abilities) according to Van der Plank (1968).

The objectives of this study were to clarify morphological variability of zoosporangia produced by *P. halstedii* on the surface of cotyledons in plants infected through roots. Studies were made of the effects of the host plant (age and genotype) and of pathogen diversity (virulence and aggressiveness).

Materials and methods

Fungal strains:

Ninety two of 94 strains used in this study were isolated in France and collected at INRA, Clermont-Ferrand. Strain MIL006 was supplied by T.Gulya (USDA, USA) and strain MIL008 was isolated in Spain. Table 1 gives the principle characteristics of these strains. Strains MILxxx

and strains DUxxxx were isolated from naturally infected plants. Strains MILxxx Mx and DUxxxx Mx are single zoosporangial strains that were obtained according to the method described by Sakr et al. (2007). Virulence profiles of all races (Table 2) were obtained according to the method described by Tourvieille de Labrouhe et al. (2000). Manipulation of this quarantine parasite respected European regulations (No 2003/DRAF/70).

Sunflower genotypes and test conditions:

Zoosporangia were harvested according to the method described by Cohen and Sackston (1973) on sunflower genotypes susceptible (not carrying *Pl* genes) to all the races of *P. halstedii* used in this study:

“Peredovik”, an open pollinated variety of Russian origin, largely used for multiplication and conservation of *P. halstedii*,

“BT” and “FU”, inbred lines from INRA France (Vear et al. 2007).

After the contamination of 10 germinated seeds, sporulation was obtained after 12 days at 18°C and in long day length (16 h /24), in conditions of saturated humidity for 48h. For specific study of the impact of plant age on zoosporangia characters, incubation period was 7, 9, 11 and 13 days followed by 24 hours at 100%RH to obtain sporulation on 10 cotyledons infected for each incubation period.

Morphological observations

The zoosporangia suspensions were obtained by grouping, for each treatment, all sporulated cotyledons in a small container and adding 1 ml of physiological water for each cotyledon (9g NaCl + 1L permuted water). This slowed zoosporangia maturation to facilitate observations before liberation of zoospores (Sakr et al. 2007). Identification of form and measurement of size was carried out on 50 zoosporangia per treatment under a light microscope (magnification X400) with 2 replications.. Zoosporangia size was calculated from an oval $\pi \times a \times b$, $a = \frac{1}{2}$ length, $b = \frac{1}{2}$ width.

Measurements of aggressiveness

All aggressiveness criteria were measured on the sunflower genotype “FU” which shows high level of quantitative resistance (Vear et al., 2007).

Sporulation density: This was defined as the number of zoosporangia produced by one cotyledon. For measurement, the cotyledons of seedlings showing sporulation after a given incubation period, were grouped together in a small container. One ml of physiological water (9g NaCl / 1L permuted water) per cotyledon were added and the whole vigorously shaken before counting (18 observations per sample) under an optical microscope with a Malassez cell. The

statistical analyses concerned concentrations measured after 12 and 13 days incubation, which corresponded to the maximum quantity of spores produced by a cotyledon.

Latent period: This was defined as the number of days incubation necessary to obtain 80% sporulating plants. For measurement, 6 treatments were carried out: sixty infected germinating seeds were planted out in 6 pots (10 seeds per pot). Each day, after incubation for 7 to 12 days, one pot was covered with a polythene bag. After 24 hours at 100%RH, the number of seedlings in the pot showing sporulation on the shoot was noted, with a +/- reading. These observations were combined to give the number of plants expressing symptoms after 13 days incubation, which enabled calculation of the percentage of diseased plants expressing symptoms for each incubation period compared with the total after 13 days. The latent period was read from a quadratic regression curve drawn from percent plants sporulating, including the intermediate points and the first day when 100% sporulation was obtained. For each strain, the experiment was repeated 3 times.

Hypocotyl length: corresponds to the distance from the stem base to cotyledon insertion which measured after 13 days incubation on diseased plants that showing sporulation on the shoot. It was compared with the length measured on the same but uninfected genotype grown in identical conditions. Data are expressed in mm. For each strain 10 plants were measured, the experiment was repeated 3 times.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using StatBox 6.7® (GrimmerSoft) software. Before statistical analysis, the percentages were transformed using the $\text{Arcsin}\sqrt{}$ function. Factorial analyses of variance were made on complete randomized designs with two factors, either *Plasmopara* strain and infected plant age or *Plasmopara* strain and sunflower genotype. There were 2 replications in both cases. Tables 3, 4 and 5 present F-tests and least significant differences (LSD) for each character. The sample correlation coefficients (Pearson r) were calculated using overall mean values per treatment at $P=0.05$.

Results

Form and size of zoosporangia:

The results showed that the two forms most observed were oval and round, the other shapes such as pear made up less than 1% of zoosporangia, irrespective of the *P. halstedii* strain (Fig. 1).

Table 3 presents the proportions of oval zoosporangia for 8 *P. halstedii* strains and 4 sunflower seedling ages. There were highly significant differences both between strains (from 59.3% for DU1776 to 73.8% for DU1782) and between different host ages. The proportion of

oval zoosporangia from plants aged between 8 and 12 days (69.6 %) was significantly higher than from plants aged 14 days (64.1 %). There was no significant interaction between the 2 factors.

Table 4 presents characteristics of zoosporangia on different sunflower genotypes. The proportion of oval zoosporangia varied from 18% for strain MIL014 on “Peredovik” to 94% for the monozoosporangial strain MIL001 M2 on “FU”. The proportion of oval zoosporangia varied significantly both according to strain and according to host plant genotype with a significant interaction between the 2 factors. “BT” had the lowest proportion of oval zoosporangia for all of the strains of *P. halstedii*, with a mean of 58.7% compared with 71.7% on “Peredovik” and 73.3% on “FU”, but with strains DU1651 and DU1659, there was much less difference than with DU1571 and DU1845, for example.

Zoosporangia size also varied significantly according to strain and host genotype with an interaction between the 2 factors. In all our surveys, the minimum was 264.7 μm^2 for strain MIL007 harvested on “Peredovik” and the maximum 918.6 μm^2 for monozoosporangial strain MIL002 M3 harvested on “FU”. Strain DU1635 had, on average, the smallest zoosporangia (377.3 μm^2), strain DU1651 the largest (543.3 μm^2) (Table 4). The variation in size was particularly clear between host genotypes: the smallest zoosporangia were observed on “Peredovik” with a mean of 378.7 μm^2 and extremes of 283.2 and 502.1 μm^2 compared to a mean of 564.6 μm^2 on "FU ", with extremes of 534.4 and 600.4 μm^2 . On BT there was considerable variation: from 297.1 to 577.1 μm^2 around a mean of 484.7 μm^2 .

For a given strain, the size of round zoosporangia was generally less than that of oval forms. However, no significant correlation was observed between the proportion of oval zoosporangia and mean size, irrespective of form.

Relation between morphological aspects of zoosporangia and virulence:

We compared zoosporangia form and size of the 17 races available in our laboratory on one sunflower genotype “Peredovik”. For 5 of them, several strains were available: races 304 (5 strains), 314 (4 strains), 704 (4 strains), 710 (20 strains) and 714 (4 strains). Results concerning zoosporangia form are presented in Figure 2. The proportion of oval zoosporangia varied within the races for which several strains were available, for example for race 710 it varied from 39% to 93%. Only 3 races showed less than 30% of the oval form, but for all these, only one strain was available: races 334 and 770 were both isolated once in France and race 330 (USA) is an American race not found in France. Zoosporangia size (Figure 3) also varied considerably within and between races, with no relation to form. There was thus no relationship between

zoosporangia form or size and virulence characteristics as defined by Tourvieille de Labrouhe et al. (2000).

Relationship between morphological aspects of zoosporangia and aggressiveness:

Table 5 presents a comparison between aggressiveness criteria of 50 *P. halstedii* strains and proportions of oval form and zoosporangia size. Sporulation density varied six fold: 333×10^3 zoosporangia were produced by cotyledons for strain DU1915 M2 and 1968×10^3 for strain MIL001 M2. The latent period ranged from 7.8 days for strains DU1842 M4, DU1842 M5 and DU1943 M4 to 12.5 days for strain DU1734 M7. Hypocotyl length varied from 25.6 mm for strain DU1915 M6 to 44.9 mm for strain DU1943 M5. The proportion of oval form varied from 37 to 94% and the zoosporangia size from 270.8 to 592.9 μm^2 . Latent period and hypocotyl length were not correlated with form or size of zoosporangia ($r = 0.053$ and $r = 0.056$ for latent period, $r = -0.127$ and $r = 0.170$ for hypocotyl length). In addition, there was no significant correlation between the proportion of oval zoosporangia and sporulation density ($r = 0.179$). However, a significant negative correlation ($P = 0.05$) appeared between zoosporangia size and sporulation density: $r = -0.290$.

Discussion

Identification of *P. halstedii* races is difficult because it is based on combination of disease symptoms and host preference (Spring et al. 2003). Recently, Delmotte et al. (2008) showed the interest of EST to characterise *P. halstedii* isolates, but races can still not be defined with certainty. It would therefore be helpful if morphological characters could be used. In this study, we analysed the form and size of zoosporangia on a large collection of *P. halstedii* strains to determine morphological variability of this species. Comparison of these morphological aspects with the two components of pathogenicity, virulence and aggressiveness could help to decide about the diagnostic value of morphological characters in population studies of plant parasites.

The results showed that oval and round zoosporangia are the most common forms, present in all strains of *P. halstedii* analysed (Figure 2, Tables 3, 4 and 5). Our results, on zoosporangia produced on sunflower cotyledons showed that pear shape was rarely found. However, Delanoë (1972) showed that the dominate forms in underground zoosporangia were pear and lemon. In the present experiments, the proportion of round and oval forms varied according to three factors. First, strains showed different proportions of the oval form (from less than 20% to more than 90%). These results are in contrast with those of Spring et al. (2003) who found no differences concerning morphological aspects of zoosporangia and sporangiophores. Secondly, sunflower genotype was also an important factor; under our test conditions, the

proportion of oval zoosporangia doubled according to host genotype. This finding is in agreement with Delanoë (1972) who found that form of zoosporangia on cultivated sunflower was highly variable. Finally, this proportion seems to change with duration of incubation. In *P. halstedii*, Nishimura (1922), Hall (1989) and Spring et al. (2003) indicated only oval forms in zoosporangia produced on leaves and Grief (pers. comm.) did not observe the round form in *Plasmopara viticola* on vine (*Vitis vinifera*). Conversely, only the round form was reported for *Plasmopara angustiterminalis* on *Xanthium strumarium* (Komjati et al. 2007). Whereas identification of morphological characters of facultative parasites can be carried out easily on artificial medium (Semal et al. 1989), obligate parasites can only be studied in co-culture with their host plant. Since the present results have shown that morphological characters vary according to the host sunflower genotype, if these characters are to be used to identify groups of strains, it would be necessary to make observations on only one sunflower genotype.

Round zoosporangia were always smaller than oval, but these differences did not explain all dissimilarities in size among strains. From observations of 10600 zoosporangia, zoosporangia length varied from 11.4 to 62.4 μm with a mean of $20.6 \pm 0.08 \mu\text{m}$ and width ranged from 11.4 to 100.8 μm with a mean of $24.6 \pm 0.14 \mu\text{m}$. Both the effects of host plant genotype and the different strains used in other studies may explain the different measurements reported: 30-33 μm to 36-57 μm in Nishimura (1922), 14-20 μm to 18-30 μm according to Hall (1989) and 12-16 μm to 27-40 μm in Spring et al. (2003).

The proportion of zoosporangia of different forms and their sizes do not appear to be useable to differentiate races. Only the races 330 (USA) (distinguished from 330 (ESP) by the reaction of INRA line XRQ), 334 and 770 differ from the others by their small proportion of oval zoosporangia and these three races were each represented by only one sample in this study. It is probable that morphological characters of *P. halstedii* zoosporangia are independent of virulence profiles. This is in contrast with the results of De Wet et al., (2002 and 2003) who observed morphological differences between strains of *Sphaeropsis sapinea*, which divided them into 3 morphotypes (A, B and C) that presented differences in pathogenicity (virulence and aggressiveness).

The results also showed that zoosporangia morphology did not distinguish strains according to their aggressiveness, except for a possible link that may exist between sporulation density and zoosporangia size ($r = -0.290$) which suggests a physiological balance between quantity and size. For a facultative parasitic Oomycete, *Phytophthora capsici*, Islam et al. (2004) did not find any relationship between groups of isolates characterised for their growth patterns on artificial medium and their aggressiveness (the term of symptom severity used in Islam et al.

(2004) has the same meaning as the term “aggressiveness” used in this study). Other facultative parasites may show correlations between morphological aspects measured on artificial medium and aggressiveness criteria. In the pathosystem *Sclerotinia sclerotiorum* / rapeseed and mustard, Ghasolia and Asha (2007) described 9 groups based on morphological characters which were divided into 2 series according to degree of aggressiveness.

In conclusion, it appears that the morphological characters of zoosporangia in *P. halstedii* depend not only on pathogen strain but also on growth conditions such as incubation duration, plant part infected and, more especially on host plant genotype. A possible explanation of this is that, since *P. halstedii* is an obligate parasite, the size of the spores, and the quantity produced, depend primarily on the sources on nutriment, therefore on plant host genotype. These observations confirm that zoosporangia morphology is not usable to distinguish between races. Since tools for classification of obligate parasitic Peronosporaceae are very limited (Spring and Thines 2004), it appears desirable to continue research for new methods.

Acknowledgements

We would like to thank the Syrian Commission of Energy Atomic for a Doctoral Scholarship concerning the first author. This work was carried out with the financial support of the French Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM).

References

- Cohen Y, Sacksto WE (1973) Factors affecting infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. Canadian Journal of Botany 51: 15-22
- Delanoë D (1972) Biologie et épidémiologie du mildiou du tournesol (*Plasmopara helianthi* Novot.). Informations Techniques CETIOM 29: 1-40
- De Wet J, Burgess T, Slippers B, Preisig O, Wingfield BD, Wingfield MJ (2003) Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. Mycological Research 107: 557-566
- De Wet J, Wingfield MJ, Coutinho T, Wingfield BD (2002) Characterisation of the C morphotype of the pine pathogen *Sphaeropsis sapinea*. Forest Ecology and Management 161: 181-188
- Delmotte F, Giresse X, Richard-Cervera S, M'Baya J, Vear F, Tourvieille J, Walser P, Tourvieille de Labrouhe D (2008) Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. Infection, Genetics, and Evolution (in press)

Ghasolia RP, Asha S (2007) Morphological and pathogenic variability in rapeseed and mustard isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Indian Phytopathology 60: 76-81

Göker M, Voglmayr H, Riethmüller A, Oberwinkler F (2007) How do obligate parasite evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. Fungal Genetics and Biology 44: 105-122

Hall G (1989) CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, Set 98, Nos. 971-980. Mycopathologia 106: 183-211

Ioos R, Laugustin L, Rose S, Tourvieille J, Tourvieille de Labrouhe D (2007) Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. Plant Pathology 56: 209-218

Islam SZ, Badadoost M, Lambert KN, Ndeme A, Fouly HM (2004) Characterization of *Phytophthora capsici* Isolates from Processing Pumpkin in Illinois. Plant Disease 89: 191-197

Komjati H, Walcz I, Viranyi F, Zipper R, Thines M, Spring O (2007) Characterization of a *Plasmopara angustiterminalis* isolate from *Xanthium strumarium*. European Journal of Plant Pathology 119: 421-428

Nishimura M (1922) Studies in *Plasmopara halstedii*. I. The infection of *Helianthus annuus* L. by zoospores. J. Coll. Agric. Hokkaido Imp. Univ. XL 3: 185-216

Novotelnova NS (1966) Downy mildew in sunflower. Nauka AS, Moscow

Sakr N, Ducher M, Tourvieille J, Walser P, Tourvieille de Labrouhe D (2007) A new method to obtain monozosporangial isolates of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*). Cryptogamie Mycologie 28: 123-131

Seiler GJ, Gulya TJ (2000) Evaluation of wild sunflower species for downy mildew resistance. In Proceeding of the 13th International Sunflower Conference. Pisa, Italy pp. 1368-1374

Semal J, Frasel J, Impens R, Kummert J, Lepoivre P, Meulemans M, Seilleur P, Vander veken J, Viseur J (1989) Traité de Pathologie Végétale. Les Presses Agronomiques de Gembloux, Belgium

Spring O, Bachofer M, Thines M, Riethmüller A, Göker M, Oberwinkler F (2006) Intraspecific relationship of *Plasmopara halstedii* isolates differing in pathogenicity and geographic origin based on ITS sequence data. European Journal of Plant Pathology 114: 309-315

Spring O, Thines M (2004) On the necessity of new characters for classification and systematics of biotrophic Peronosporomycetes. Planta 219: 910-914

Spring O, Voglmayr H, Riethmüller A, Oberwinkler F (2003) Characterization of a *Plasmopara* isolate from *Helianthus x laetiflorus* based on cross infection, morphological, fatty acids and molecular phylogenetic data. *Mycological Progress* 2: 163-170

Tourvieille de Labrouhe D, Pilorge E, Nicolas P, Vear F (2000) *Le mildiou du tournesol*. CETIOM, INRA Editions, France

Van der Plank JE (1968) *Disease resistance in plants*. Academic press, New York and London

Vear F, Serre F, Roche S, Walser P, Tourvieille de Labrouhe D (2007) Recent research on downy mildew resistance useful for breeding industrial – use sunflowers. *Helia* 30: 45-54

Table 1: List of *Plasmopara halstedii* strains used in the present study

Year			Year			Year		
Strain	Race	isolated	Strain	Race	isolated	Strain	Race	isolated
MIL001 ^{ab}	100	1960	DU1957 ^b	314	2006	DU1753	710	2006
MIL001 M2	100	2006	MIL014 ^{ab}	334	2004	DU1776	710	2006
MIL001 M3	100	2005	MIL006 ^b	330 (USA)	1999	DU1777	710	2006
MIL001 M4	100	2005	MIL008 ^b	330 (ESP)	2000	DU1782	710	2006
MIL001 M5	100	2005	MIL005 ^{ab}	700	1995	DU1839	710	2006
MIL001 M6	100	2006	MIL002 ^{ab}	710	1988	DU1845 ^b	710	2006
MIL004 ^{ab}	300	1995	MIL002 M1	710	2005	DU1865	710	2006
DU1842 ^b	300	2005	MIL002 M2	710	2005	MIL003 ^{ab}	703	1989
DU1842 M1	300	2006	MIL002 M3	710	2005	MIL011 ^{ab}	704	2002
DU1842 M2	300	2006	MIL002 M4	710	2005	DU1656 ^b	704	2006
DU1842 M3	300	2006	MIL002 M5	710	2005	DU1657 ^b	704	2006
DU1842 M4	300	2006	DU1524 ^b	710	2005	DU1734 ^b	704	2005
DU1842 M5	300	2006	DU1529 ^b	710	2005	DU1734 M1	704	2005
MIL007 ^{ab}	304	2000	DU1530 ^b	710	2005	DU1734 M2	704	2005
DU1661 ^b	304	2005	DU1537 ^b	710	2005	DU1734 M3	704	2005
DU1767 M1	304	2006	DU1552	710	2005	DU1734 M7	704	2005
DU1767 M2	304	2006	DU1554 ^b	710	2005	DU1734 M8	704	2005
DU1767 M3	304	2006	DU1555 ^b	710	2005	MIL015 ^{ab}	707	2004
DU1767 M4	304	2006	DU1558 ^b	710	2005	MIL012 ^{ab}	714	2002
DU1767 M5	304	2006	DU1559 ^b	710	2005	DU1713 ^b	714	2005
DU1869 ^b	304	2005	DU1564	710	2005	DU1915 ^b	714	2005
DU1962 ^b	304	2006	DU1570 ^b	710	2005	DU1915 M1	714	2005
MIL010 ^{ab}	304	2002	DU1571 ^b	710	2005	DU1915 M2	714	2005
MIL013 ^{ab}	307	2002	DU1629 ^b	710	2005	DU1915 M3	714	2005
MIL009 ^{ab}	314	2001	DU1630 ^b	710	2005	DU1915 M5	714	2005
DU1650 ^b	314	2005	DU1632 ^b	710	2005	DU1915 M6	714	2005
DU1934 ^b	314	2005	DU1635 ^b	710	2005	DU1939 ^b	714	2002
DU1943 M1	314	2006	DU1640 ^b	710	2005	MIL016 ^{ab}	717	2004
DU1943 M2	314	2006	DU1647 ^b	710	2005	MIL017 ^{ab}	730	2005
DU1943 M3	314	2006	DU1651 ^b	710	2005	MIL018 ^{ab}	770	2007
DU1943 M4	314	2006	DU1659 ^b	710	2005			
DU1943 M5	314	2006	DU1670	710	2005			

^a French reference strains^b strains used for studying relations between morphological characters and race virulence profile on sunflower genotype “Peredovik”.

Table 2: Virulence* of 17 *Plasmopara halstedii* races on sunflower differential lines

Race	Differential lines								
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
	Ha-304 ^a	Rha-265 ^a	Rha-274 ^a	PMI3 ^b	PM-17 ^a	803-1 ^c	HAR-4 ^a	QHP1 ^b	Ha-335 ^a
100	S	R	R	R	R	R	R	R	R
300	S	S	R	R	R	R	R	R	R
304	S	S	R	R	R	R	R	R	S
307	S	S	R	R	R	R	S	S	S
314	S	S	R	S	R	R	R	R	S
334	S	S	R	S	S	R	R	R	S
330USA	S	S	R	S	S	R	R	R	R
330ESP	S	S	R	S	S	R	R	R	R
700	S	S	S	R	R	R	R	R	R
710	S	S	S	S	R	R	R	R	R
703	S	S	S	R	R	R	S	S	R
704	S	S	S	R	R	R	R	R	S
707	S	S	S	R	R	R	S	S	S
714	S	S	S	S	R	R	R	R	S
717	S	S	S	S	R	R	S	S	S
730	S	S	S	S	S	R	R	R	R
770	S	S	S	S	S	S	R	R	R

^a USDA genotypes (USA)^b INRA genotypes (France)^c IFVC genotypes (Yugoslavia)

* S: susceptible. R: resistant (Tourvieille de Labrouhe et al., 2000)

Table 3: Percentage of oval zoosporangia according to infected plant age for 8 strains of *Plasmopara halstedii* on sunflower open pollinated variety “Peredovik” (mean for 2 replications of 50 zoosporangia)

Strain	Infected plant age				Mean
	8 days	10 days	12 days	14 days	
DU1635	66	71	68	65	67.5
DU1651	67	76	66	65	68.5
DU1659	75	61	67	73	69.0
DU1670	68	67	73	64	68.0
DU1753	75	60	72	62	67.3
DU1776	58	64	58	57	59.3
DU1777	74	73	68	61	69.0
DU1782	74	70	85	66	73.8
mean	69.6	67.8	69.6	64.1	

F strains: 4.29** LSD ($P=0.05$) treatments: 11

F plant age: 3.95** LSD strains: 5.7

F interactions: 1.77ns LSD plant age: 4.0

Table 4: Zoosporangia form and size for 6 strains of *Plasmopara halstedii* obtained on three sunflower genotypes sunflower: “Peredovik”, “BT” and “FU”

Strain	% of oval zoosporangia ^(x)				Size of zoosporangia in μm^2 ^(y)			
	Peredovik	BT	FU	mean	Peredovik	BT	FU	mean
DU1555	41	61	71	57.7	300.5	532.5	534.4	455.8
DU1571	85	41	61	62.3	381.8	461.6	549.4	464.3
DU1635	71	55	83	69.7	283.2	297.1	551.6	377.3
DU1651	75	74	78	75.7	502.1	527.3	600.4	543.3
DU1659	79	73	73	75.0	311.5	577.1	578.2	488.9
DU1845	79	48	74	67.0	492.9	513.6	573.5	526.7
mean	71.7	58.7	73.3		378.7	484.7	564.6	
F strains: 6.66** LSD treatments: 14.1					F strains: 14.2** LSD treatments: 80.9			
F genotypes: 17.15** LSD strains: 7.1					F genotypes: 70.4** LSD strains: 47.1			
F interactions: 7.29** LSD genotypes: 5.8					F interactions: 6.39** LSD genotypes: 33.3			

^x mean proportion of oval zoosporangia for 2 replications of 50 zoosporangia.

^y mean size for 2 replications of 50 zoosporangia

Table 5: Aggressiveness criteria and morphological characters of zoosporangia obtained on sunflower genotype “FU” for 50 strains of *Plasmopara halstedii*

Strains of <i>P.halstedii</i>	Sporulation density in 10^3 zoosporangia per cotyledon ^v	Latent period in days ^w	Hypocotyle length in mm ^x	% of oval zoosporangia ^y	Size of zoosporangia in μm^2 ^z
DU1915 M2	333.3	11.9	28.2	90	477.8
DU1915 M3	390.5	10.2	29.6	93	734.6
DU1915 M5	407.0	11.5	26.7	86	374.6
DU1734 M1	436.5	11.0	26.6	74	505.4
MIL002 M2	545.0	11.8	32.8	92	513.3
DU1734 M7	558.0	12.5	28.3	74	302.2
MIL002 M5	555.5	10.5	27.4	53	419.4
DU1552	561.5	9.7	37.6	77	558.5
DU1753	566.0	8.8	32.4	72	547.1
DU1845	582.0	9.6	36.0	74	573.5
DU1734 M3	584.0	10.5	26.8	68	314.3
DU1915 M1	619.5	10.6	28.2	87	320.5
DU1839	681.5	9.1	37.7	78	518.5
DU1865	686.0	9.4	35.1	68	497.2
DU1782	714.0	9.1	35.0	78	546.4
DU1777	720.5	8.5	38.0	74	513.4
DU1555	735.5	9.1	39.6	71	534.4
DU1564	743.0	9.3	37.0	61	510.9
MIL002 M1	743.5	10.4	28.3	82	463.5
DU1915 M6	761.5	11.2	25.6	87	358.9
DU1571	774.0	9.9	40.0	61	549.4
DU1734 M2	771.5	10.9	26.6	68	357.1
DU1734 M8	806.5	11.6	31.0	89	436.9
MIL002 M4	823.5	10.3	26.1	37	352.9
DU1776	830.0	8.8	37.6	69	485.7
MIL002 M3	845.0	11.1	29.6	90	918.6
DU1651	947.0	8.8	36.6	78	578.2
DU1659	964.5	8.7	28.8	73	600.4
DU1943 M3	1130.0	8.9	35.6	80	387.6
DU1670	1128.5	8.9	40.7	67	465.8
DU1635	1185.5	8.6	39.0	83	551.6
MIL001 M4	1197.0	10.2	28.3	88	392.9
DU1943 M5	1210.0	7.9	44.9	56	380.4
DU1767 M5	1231.5	8.0	27.4	63	344.7
MIL001 M3	1269.5	9.3	28.7	94	434.9

DU1943 M2	1274.5	8.5	40.9	86	425.4
DU1767 M1	1303.5	7.9	35.2	86	394.0
MIL001 M5	1316.0	8.9	27.9	91	418.7
DU1943 M1	1325.0	8.6	42.1	93	424.8
DU1767 M2	1360.0	8.7	27.9	78	422.3
DU1842 M4	1403.0	7.8	33.6	82	315.2
MIL001 M6	1411.0	8.6	36.8	90	432.2
DU1767 M4	1531.0	8.6	26.2	91	478.7
DU1767 M3	1625.5	8.0	27.9	90	505.2
DU1842 M1	1660.5	7.9	29.1	88	398.0
DU1842 M2	1719.5	8.1	28.4	89	511.7
DU1842 M5	1742.0	7.8	35.5	89	381.4
DU1943 M4	1826.5	7.8	33.6	56	372.0
DU1842 M3	1832.5	8.8	29.0	68	436.4
MIL001 M2	1968.0	9.1	32.4	87	315.8
F strains	12.39**	55.47**	5.46**	7.52**	8.40**
LSD strains	357	0.53	6.12	13.2	110.3
Number	2	3	3	2	2
replications					

^v 18 counts per replication ^w 10 plants per replication ^x 10 plants per replication

^y 50 zoosporangia per replication

^z 50 zoosporangia per replication.

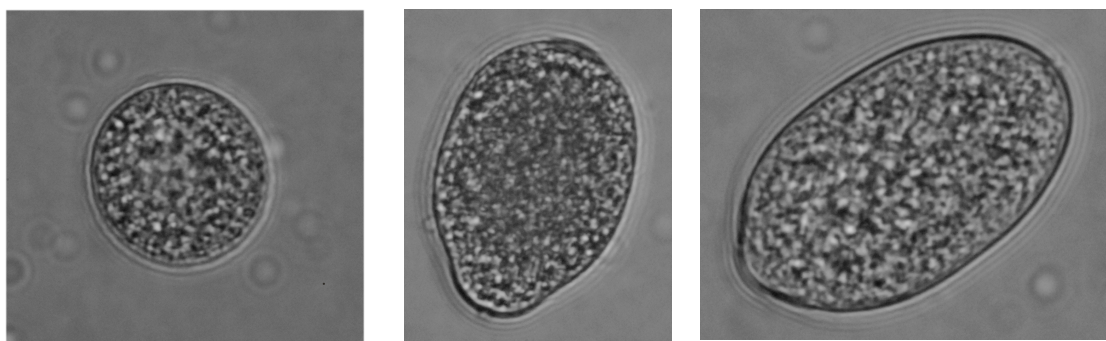


Fig. 1: *Plasmopara halstedii* zoosporangia forms observed on sunflower cotyledons: round (left) pear (centre) and oval (right)

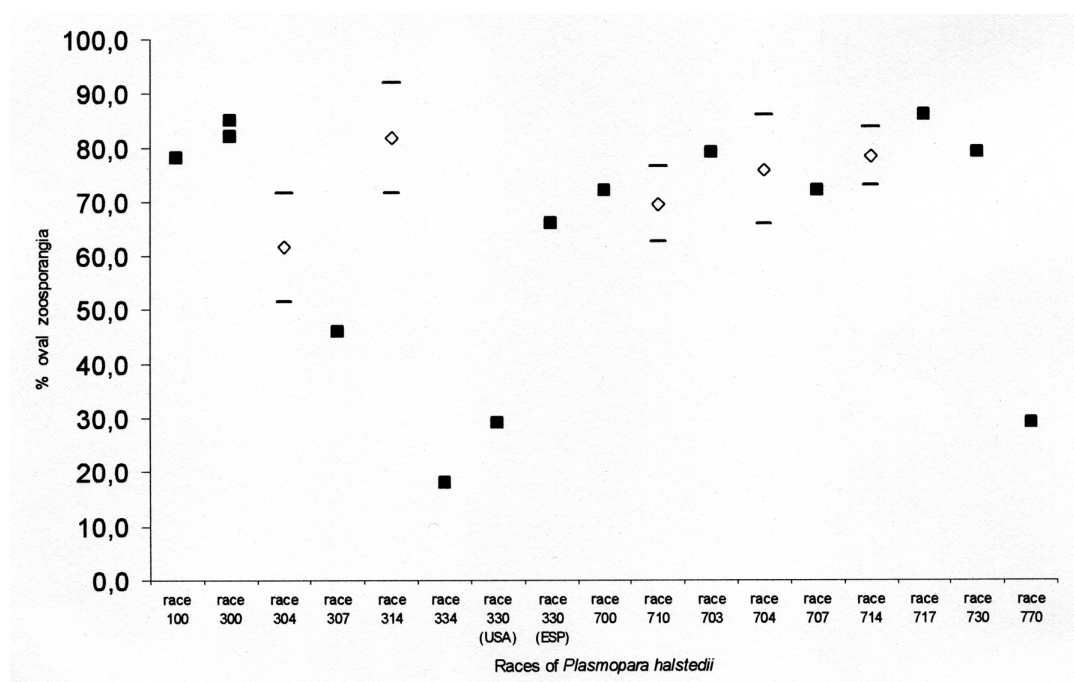


Fig. 2: Proportion of oval zoosporangia of 17 races of *Plasmopara halstedii* obtained on sunflower genotype “Peredovik”, ◇ mean of races representing with more than three strains, — confidence limits at $P=0.05$, ■ mean of races representing with one or two strains

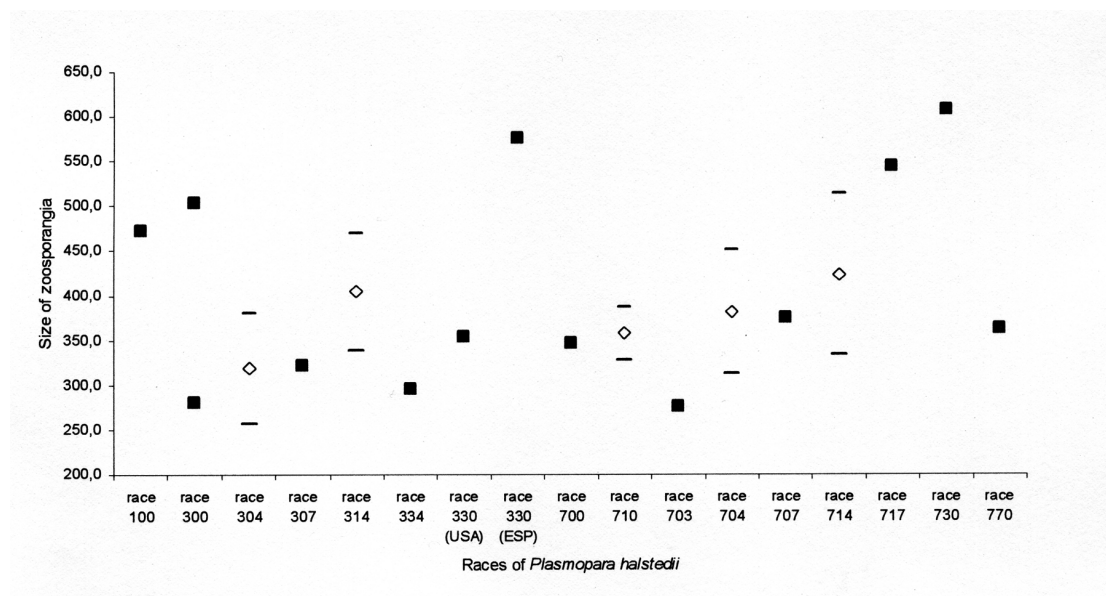


Fig. 3: Size of zoosporangia (μm^2) of 17 races of *Plasmopara halstedii* obtained on “Peredovik”, \diamond mean of races representing with more than three strains, — confidence limits at $P=0.05$, \blacksquare mean of races representing with one or two strains

Bilan

Les mesures ont porté sur 10^4 zoosporanges. Elles montrent que la largeur des zoosporanges de *P.halstedii* varie de 11,4 à 62,4 μm pour une moyenne de $20,59 \pm 0,08 \mu\text{m}$ et la longueur varie de 11,4 à 100,8 μm pour une moyenne $24,6 \pm 0,14 \mu\text{m}$.

Plasmopara halstedii produit deux types de zoosporanges (sphériques et ovoïdes) et cela quelles que soient les souches analysées. Les taux respectifs de ces deux formes varient entre les souches. Cependant nous avons montré que les caractères morphologiques des zoosporanges (taille et forme) ne sont pas liés à la virulence ni à l'agressivité d'autant que le génotype de la plante-hôte et l'âge des plantes influencent les caractères analysés et en particulier pour la forme des sporanges.

Il est évident que les caractères morphologiques des zoosporanges dépendent beaucoup des conditions culturales de *P. halstedii*. De ce fait, leur exploitation ne serait possible que s'ils étaient obtenus dans des conditions très homogènes et seraient, de toute façon peu informatifs pour notre problématique.

Article 4

Etude de l'agressivité de différentes races de *Plasmopara halstedii*

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence un éventuel lien entre l'agressivité et la modification des profils de virulence. Pour cela, nous avons comparé sur quatre critères d'agressivité, cinq variants (souches présentant un profil de virulence différent des souches parentales) issus d'une population initiale constituée d'un mélange entre les souches de référence MIL001 (race 100) et MIL002 (race 710). Pour prendre en compte une possible variabilité intra souche, les analyses ont porté sur cinq isolats monozosporanges par souche. Aux facteurs d'agressivité « durée de latence » et « densité de sporulation », nous avons rajouté des facteurs qui nous ont semblé pertinents : le « taux de réussite de l'infection » qui peut fluctuer en relation avec le pouvoir infectieux des zoosporanges et la « taille des hypocotyles », ce facteur reflète un des symptômes caractéristiques du mildiou qui est le nanisme et qui ne serait pas indépendant de l'agressivité des souches.

Nous avons mis en évidence un comportement homogène des souches quel que soit le génotype de l'hôte (article 2), pour nous assurer de l'absence d'un comportement spécifique à une lignée de tournesol, nous avons opté pour travailler avec deux génotypes : FU et GB qui étaient très bien caractérisés en conditions d'infection naturelle (quatre années d'expérimentation). Malheureusement, la lignée GB s'est avérée beaucoup trop sensible dans nos conditions d'expérimentation et nous n'avons pu exploiter que les résultats obtenus sur FU.

Les cinq variants sont issus d'un mélange de deux souches de profil très différent, il nous a semblé intéressant de savoir s'il était possible de préciser les liens génétiques entre les sept souches en analysant douze marqueurs EST.

Il n'est pas possible d'analyser trente cinq souches en une seule expérimentation, nous avons donc été contraints à étaler cette expérimentation sur plusieurs semaines dans différentes enceintes de culture. Afin de vérifier que tous les tests biologiques sont réalisés dans des conditions climatiques homogènes, nous avons vérifié que la température, l'humidité relative et l'intensité lumineuse sont bien identiques dans nos différentes enceintes et à différentes périodes de l'année. L'homogénéité des conditions de culture a également été vérifiée sur des mesures réalisées sur des plantes saines dans les trois chambres de culture et à différentes périodes de l'année (voir annexe).

Relation entre la virulence et l'agressivité chez *Plasmopara halstedii*.

Résumé

Plasmopara halstedii, Oomycète responsable du mildiou du tournesol, qui présente de nombreuses races physiologiques, n'avait pas encore fait l'objet d'étude sur la relation entre la virulence et l'agressivité. Sept souches présentant des profils de virulence différents sont comparées à travers 5 isolats monospore/souche. Les critères étudiés en laboratoire sont i) le taux de réussite de l'infection, ii) la durée de la période de latence, iii) la densité de sporulation et iv) la réduction de taille des hypocotyles. Les tests ont été réalisés sur deux génotypes de tournesol ne disposant d'aucun gène de résistance race spécifique mais présentant des niveaux de résistance quantitative très différents. Une analyse de la structure génétique des 7 souches à l'aide de 12 marqueurs EST a permis de préciser leurs liens génétiques.

Aucune différence n'a été observée sur la lignée de tournesol sensible, par contre la lignée résistante a permis de différencier les souches. Les analyses des 5 isolats monospores de chaque souche n'ont pas fait apparaître une grande variabilité intra souche. Par contre, les 7 souches se classent en deux groupes bien distincts sur les critères « durée de la période de latence » et « densité de sporulation ». L'un des groupes rassemble toutes les souches des profils 100, 300, 304 et 314, l'autre groupe réunit les souches 710, 704 et 714. Ce classement laisse à penser qu'il existe un lien entre virulence et l'agressivité. Si on compare les trois souches qui ont le même fond génétique, les souches de profil 300 et 304 sont plus virulentes et agressives que la souche-mère de profil 100. Les deux composantes de pathogénicité sont corrélées positivement.

Mots clés : *Helianthus annuus*, résistance quantitative, virulence

Introduction

Plasmopara halstedii (Farl.) Berl et de Toni est l'Oomycète responsable du mildiou du tournesol. Les plantes mildiouées présentent de fortes sporulations sur les organes aériens et un nanisme prononcé (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). Le pathogène qui est un biotrophe strict, se caractérise par la présence de très nombreux pathotypes, Gulya (2007) en dénombre 35 répartis sur les différents continents. Cinq pathotypes sont régulièrement observés : les races 100 et 300 qui correspondent aux pathotypes les plus anciens et les races 700, 710 et 730 apparues dans les années 80. Ces pathotypes se caractérisent par leur profil de virulence mesuré sur une gamme de lignées hôtes différentiels (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). Si de nombreuses études permettent de caractériser la variabilité de virulence de *P. halstedii* (Gulya, 2007), les analyses moléculaires menées jusqu'à présent révèlent très peu de variabilités génétiques (Roeckel-Drevet *et al.*, 1997 ; Spring *et al.*, 2006 ; Giresse *et al.*, 2007). Si on note quelques

travaux sur la variabilité de caractères morphologiques comme la taille des zoosporanges qui varie du simple au double : de 250 μ^2 à 555 μ^2 (Sakr *et al.*, 2007), sur la résistance au fongicide Métalaxyl® avec une DL50 comprise entre 5 800 et 32 900 mg a.i. Métalaxyl kg^{-1} (Albourie *et al.*, 1998) ou encore sur la composition en acides gras (Spring et Haas, 2002), aucune publication ne relate une variabilité de l'agressivité (capacité non spécifique à produire la maladie) définie par Van der Plank (1968).

Des travaux récents ont mis en évidence l'existence, chez le tournesol cultivé, d'une résistance partielle au mildiou non-race spécifique indépendante des gènes *Pl* (Vear *et al.*, 2007 ; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008). L'efficacité de cette résistance dépend essentiellement des conditions climatiques plus ou moins favorables à la maladie (Délos *et al.*, 2000) mais également de l'agressivité des souches de *P. halstedii*. La durabilité de cette résistance polygénique non-race-spécifique dépend de la capacité du parasite à développer des souches plus agressives, d'où l'importance d'étudier ce critère chez cet Oomycète.

Les mesures d'agressivité des souches d'Oomycètes pathogènes varient en fonction des caractéristiques des pathosystèmes. Le plus étudié est le mildiou de la pomme de terre pour lequel les critères suivants ont été utilisés (Miller *et al.*, 1998 ; Carlisle *et al.*, 2002) : i) la durée d'incubation ; ii) la période de latence ; iii) la fréquence d'infection ; iv) la zone sous la courbe d'expansion de lésion et v) la densité de sporulation. Dans le cas de parasites biotrophes stricts, la quantification du pouvoir pathogène est plus délicate, si la virulence se caractérise assez bien car c'est un caractère généralement qualitatif, il en est autrement pour l'agressivité. Hooftman *et al.*, (2007) souhaitant comparer deux souches de *Bremia lactucae*, responsable du mildiou de la laitue, proposent des mesures quantitatives basées soit sur une note de 0 à 3 selon l'importance des symptômes foliaires observés sur plusieurs génotypes de laitue, soit sur la quantification de l'invasion des tissus en comptant après coloration, la densité de haustoria produits par le parasite ou encore en prenant en compte des caractéristiques agronomiques (quantité et poids de semence). Pour leur part, Sinclair et Griffiths (2000) utilisent le critère 'réduction de croissance' du frêne ou de la pervenche pour mesurer l'agressivité du 'Ash Yellow's phytoplasme'.

Dans cette étude, nous avons analysé l'agressivité de 7 pathotypes de *P. halstedii* incluant la race 100 présente en France depuis les années 60 (Penaud *et al.*, 1997), la race 710 sans doute introduite des Etats-Unis durant les années 80 (Roedel-Drevet *et al.*, 2003) ainsi que 5 variants (300, 304, 700, 704 et 714) issus de ces pathotypes afin de mettre en évidence une relation entre la virulence et l'agressivité. Quatre facteurs intervenant dans l'agressivité ont été évalués : i) taux d'infection, ii) durée de la période de latence, iii) densité de sporulation et iv) taille des

hypocotyles. Ces facteurs ont été analysés sur des génotypes de tournesol ne présentant pas de gènes *Pl* de résistance race spécifique.

Le taux de réussite de l'infection reflète la capacité plus ou moins grande des zoosporanges à pénétrer les tissus sains de l'hôte au niveau des poils absorbants de la radicelle (Delanoë, 1972). La durée de latence correspond à la vitesse d'apparition des symptômes de mildiou sur les plantes malades. La densité de sporulation représente la capacité du champignon à envahir les tissus de l'hôte durant la période d'incubation. Le nanisme est un symptôme caractéristique des plantes malades et causé par une réduction de la concentration en IAA dans les tissus infectés (Cohen et Sakston, 1974a).

Enfin, les liens génétiques entre les 7 souches ont été précisés à l'aide de 12 marqueurs EST (Giresse *et al.*, 2007).

Matériel et méthodes

Souches de *P. halstedii*

Toutes les souches utilisées ont été récoltées en France. Elles sont multipliées sur des lignées de tournesol (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000) et maintenues en cryoconservation (Molinero-Demilly *et al.*, 2005) dans les installations disposant de l'agrément 'parasite de quarantaine' n°2003/DRAF/70 à l'Inra à Clermont-Ferrand.

Les souches MIL 001 et MIL 002 correspondent aux souches françaises de référence respectivement pour les pathotypes 100 et 710. Les souches DU xxx ont été isolées dans le cadre d'un programme d'analyse d'impact du choix variétal sur l'évolution d'une population de *P. halstedii* (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005), elles sont toutes issues d'un mélange initial constitué de MIL 001 et MIL 002. Leur profil de virulence a été obtenu selon la méthode décrite par Tourvieille de Labrouhe *et al.*, (2000) : DU 1842 = race 300 ; DU 1767= race 304 ; DU 1943 = race 314 ; DU 1734 = race 704 et DU 1915= race 714.

Pour chaque souche, nous avons isolé des individus monosporanges (Tableau 1) selon la méthode décrite par Sakr *et al.*, (2007).

Les études ont porté sur 5 isolats monosporanges par souche (M1 à M5), soit 35 isolats.

Matériel végétal (se reporter au chapitre matériels et méthodes page 35)

Conditions de réalisation des tests (se reporter au chapitre matériels et méthodes page 35 et au chapitre annexe page 131)

Mesures de l'agressivité (se reporter au chapitre matériels et méthodes page 36)

Acquisition des données moléculaires

L'extraction de l'ADN et les analyses moléculaires : pour chaque souche, l'extraction de l'ADN est réalisée sur les zoosporanges comme suivant la méthode décrite par pour *Plasmopara*

viticola. Les sept souches (MIL 001, MIL 002, DU 1842, DU 1767, DU 1943, DU 1734, DU 1915) ont été caractérisées à l'aide de 12 marqueurs EST (Giresse *et al.*, 2007).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques concernant les critères de l'agressivité (se reporter au chapitre matériels et méthodes page 37)

Les relations phylogénétiques entre les sept souches ont été obtenues par « building a neighbour-joining (NJ) tree » (Jin et Chakraborty, 1993) par l'utilisation du logiciel : Populations 1,2,28 (Langella, 1999). Une analyse Bootstrap a été réalisée sur 10.000 répétitions.

Résultats

Taux de réussite de l'infection sur les lignées « GB » et « FU »

La forte sensibilité de la lignée de tournesol « GB » observée en conditions naturelles est confirmée dans nos tests. En effet, dans nos conditions de culture, l'infection des graines germées de cette lignée ne conduit à aucune différence de taux de réussite de l'infection, de taux de sporulation et de densité de sporulation (nous avons utilisé 4 isolats monospores avec 4 profils de virulence 100, 300, 710 et 714). Les comparaisons ne seront réalisées que sur la lignée de tournesol « FU » qui présente un niveau élevé de résistance non-race spécifique.

Avec la lignée « FU », seules quelques plantes échappent à l'infection (191 sur 6 300 infectées), les taux très élevés (89,6 % à 100 %) font cependant apparaître des différences entre souches.

Variabilité intra souche (Tableau 2) : À l'exception de la souche MIL 001, toutes présentent une très grande homogénéité sur le critère « taux de réussite de l'infection ». La souche MIL 001 présente la plus grande variabilité avec la gamme la plus large : de 92 à 100 % qui restent des taux très élevés. La souche MIL 002 présente également une variabilité mais non significative (de 90 à 96 %). C'est la souche qui présente le taux de réussite en moyenne le plus faible (93 %). Les 5 variants présentent très peu de variabilité pour ce caractère.

Variabilité inter-souches (Tableau 3) : L'analyse de variance fait ressortir des différences significatives ($P = 0,00001$; $CV = 4,52$ %). Le test de Newman-Keuls classe les souches en deux groupes bien distincts. L'un regroupe les variants avec un profil de virulence commençant par 3 avec les taux de réussite les plus élevés (DU 1842, DU 1767 et DU 1943), l'autre groupe rassemble les souches d'origines MIL 001 et MIL 002 et les variants présentant un profil de virulence commençant par 7 (DU 1734 et DU 1915).

La période de latence sur la lignée de tournesol « FU »

Il apparaît impossible de rechercher les durées qui séparent l'infection des toutes premières sporulations puisque avant 7 jours les cotylédons ne sont pas toujours séparés de la

coque et qu'à partir du 8^e jour, certains isolats présentent des taux de sporulation déjà très élevés. Cependant, le protocole apparaît adapté puisqu'il a permis de calculer une durée de la période de latence (basée sur un taux de sporulation de 80 %) pour chaque isolat et cela quelle que soit sa précocité : de 7,8 jours pour l'isolat M5 de DU1842 à 12,48 jours pour l'isolat M4 de DU1734.

Variabilité intra souche (Tableau 2) : Seules les souches de référence MIL 001 et MIL 002 ne présentent pas de variabilité significative pour ce caractère. Cependant, si les différences sont significatives pour les 5 variants, les écarts sont relativement peu importants pour ceux qui présentent une durée de latence courte (de 7,80 j. à 8,83 j. pour la souche DU 1842 ; 7,88 j. à 8,89 j. pour DU 1943 et 7,94 j. à 8,74 j. pour DU 1767). Ces écarts sont légèrement plus importants pour les souches qui présentent la durée de latence la plus élevée (10,15 j. à 11,85 j. pour DU 1915 et 10,51 j. à 12,48 j. pour DU 1734).

Variabilité inter-souches (Tableau 3) : L'analyse de l'évolution du taux de sporulation en fonction de la durée d'incubation (Figure 1), fait bien ressortir les différences de comportement. L'analyse de la durée de la période de latence montre des différences significatives entre les souches ($P = 0,0$; $CV = 6,01\%$). Le test de Newnan-Keuls classe les souches en trois groupes bien distincts. Celles qui présentent la durée de la période de latence la plus courte (< 9 jours) sont les variants ayant un profil de virulence commençant par 3 (souches DU 1842, DU 1767 et DU 1943). On trouve en situation intermédiaire la souche MIL 001. Puis toutes les souches ayant un profil de virulence commençant par 7 (MIL 002, DU 1734 et DU 1915) sont regroupées et présentent les durées de latence les plus longues (> 10 jours).

Densité de sporulation sur la lignée de tournesol « FU »

Les courbes présentées dans la figure 2 montrent que les souches MIL 001, MIL 002, DU 1734 et DU 1915, n'ont pas encore atteint leur maximum de production de spores après 13 jours d'incubation même si 100 % de plantes envahies par le parasite présentent une sporulation. L'expérimentation n'a pas pu être maintenue plus longtemps car, dans nos conditions de culture à partir de 14 jours d'incubation, certaines plantules infectées présentent un pourrissement très marqué bloquant la sporulation du parasite.

Pour chaque durée d'incubation nous ne disposons que d'une seule donnée (nombre moyen de spores produites par plante malade). Les analyses statistiques ont été réalisées sur les mesures correspondant aux durées d'incubation les plus longues (12 et 13 jours) qui correspondent aux densités maxima et qui ont été traitées comme des blocs pour lesquels aucune différence significative n'est observée.

Variabilité intra souche (Tableau 2) : On observe une grande homogénéité entre les isolats monosporanges pour 5 souches (MIL 001, MIL 002, DU 1842, DU 1767 et DU 1734).

Cependant la souche DU 1943 présente une variabilité significative avec l'isolat M4 qui produit plus de $18 \cdot 10^5$ zoosporanges par cotylédon pour $12 \cdot 10^5$ en moyenne pour les 4 autres isolats monozoosporanges. De même, deux isolats (M1 et M5) de la souche DU 1915 présentent une sporulation double par rapport aux 3 autres isolats ($6,9 \cdot 10^5$ zoosporanges par cotylédon pour $3,8 \cdot 10^5$).

Variabilité inter-souches (Tableau 3) : Les différences entre souches sont très importantes, la densité de sporulation varie de $5 \cdot 10^5$ zoosporanges par cotylédon en moyenne pour la souche DU1915 à $16,7 \cdot 10^5$ zoosporanges par ml pour la souche DU1842. L'analyse de variance fait ressortir des différences significatives entre les souches ($P = 0,0$; $CV = 21,86 \%$). Le test de Newnan-Keuls classe les souches en trois groupes bien distincts. Les souches qui présentent la densité de sporulation la plus faible ($< 7,5 \cdot 10^5$ zoosporanges par ml) sont les souches ayant un profil de virulence commençant par 7. On trouve en situation intermédiaire les souches MIL 001, DU1943 et DU1767. Puis la souche DU1842 présente la densité de sporulation la plus forte ($> 16,7 \cdot 10^5$ zoosporanges par ml).

La figure 2 montre que ce classement en trois avec deux groupes principaux se retrouve quelle que soit la durée d'incubation dès le 9^e jour.

Taille des hypocotyles de la lignée de tournesol « FU »

L'infection par le mildiou provoque un raccourcissement très important de l'hypocotyle puisque les plantes infectées présentent en moyenne, un hypocotyle trois fois moins long (31,0 mm) que les plantes saines (90,0 mm) et ceci quel que soit l'isolat de *P. halstedii*. Celui qui réduit le plus la taille des hypocotyles est l'isolat monosporange M5 de la souche 1915 (714) avec une taille moyenne de 25,3 mm et celle qui le réduit le moins est l'isolat M5 1943 (314) avec une taille moyenne de 44,9 mm. Dans tous les cas, les plantes infectées présentent une taille inférieure aux plantes saines.

Variabilité intra souche (Tableau 2) : toutes les souches montrent une variabilité pour ce critère de l'agressivité

Variabilité inter-souches (Tableau 3) : La comparaison des souches basée sur l'ANOVA avec 5 répétitions par souche correspondant aux 5 isolats monospores fait apparaître une différence hautement significative entre souches ($P = 0,0$; $CV = 9,62 \%$). Cependant ce résultat est principalement dû à la souche DU 1943 qui présente une plus faible réduction de la taille des hypocotyles par rapport aux 6 autres souches.

Corrélations entre les facteurs (Tableau 4)

Les facteurs mesurés sont corrélés. Une « durée de la période de latence » longue est associée à une « densité de sporulation » faible, à une « taille de l'hypocotyle » plus réduite et

aux « taux de réussite de l'infection » les moins élevés. De même la « densité de sporulation » est corrélée positivement avec la « taille de l'hypocotyle » et le « taux de réussite de l'infection ». Seule la « taille de l'hypocotyle » présente un coefficient de corrélation non significatif au seuil 5 % avec le « taux de réussite de l'infection ».

Analyse en composante principale (ACP) (Figure 3)

Le plan F1 x F2 explique plus de 80 % de la variation totale avec une bonne contribution des quatre facteurs de l'agressivité mesurés.

Les isolats monosporanges des 5 variants (DU xxxx) sont mieux rassemblés que ceux des souches de référence MIL 001 et MIL 002 qui présentent une forte variation sur l'axe F2. Cette variation est essentiellement due au facteur « taille des hypocotyles ». Les 7 souches se classent sur l'axe F1 (« durée de la période de latence » et « densité de sporulation ») en trois groupes assez distincts : 1) les variants DU 1767 (304), DU 1842 (300), DU 1943 (314) ; le variant DU 1943 (314) se distingue cependant des deux précédents sur l'axe F2, 2) la souche MIL 002 (710) et les variants DU 1734 (704) et DU 1915 (714) et enfin 3) la souche MIL 001 en position intermédiaire.

Analyses génétiques

La combinaison des 12 marqueurs génomiques révèle 5 différents génotypes multilocus entre les 7 souches analysées. Les deux souches parentes MIL 001 et MIL 002 montrent des différences alléliques pour tous les marqueurs à l'exception de Pha54. Les trois souches (MIL 001, DU 1767 et DU 1842) ont le même fond génétique (Tableau 5). Le NJ tree confirme que les trois souches DU1915, DU1734 et DU1943 ont une position intermédiaire entre les deux souches de référence MIL 001 et MIL 002 (Figure 4).

Discussion

Tous les génotypes de tournesol ne permettent pas de mettre en évidence des différences d'agressivité entre les souches de *P. halstedii*. En effet, la lignée « GB » reconnue comme très sensible (Vear *et al.*, 2007 ; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008), réagit de façon quasi identique aux différents isolats analysés laissant croire à l'absence de variabilité de l'agressivité. Par contre, le génotype tolérant « FU » permet l'expression de la variabilité de l'agressivité. Cette constatation est en accord avec les observations de Carlisle *et al.* (2002) qui précisent que les différences d'agressivité des différents isolats de *Phytophthora infestans* se mesurent beaucoup plus facilement sur les variétés de pomme de terre qui présentent un haut niveau de résistance non-race spécifique.

Les « taux de réussite de l'infection » très élevés s'expliquent par les conditions du test très favorables pour le parasite. Les graines germées sont mises directement en contact avec une

suspension contenant 10^5 zoosporanges/ml. Meliala (2001) a montré que dans des conditions similaires, 60 % des zoosporanges libéraient leurs zoospores dans les 20 minutes qui suivent la mise en suspension. La présence de différences significatives, malgré les niveaux élevés du taux de réussite de l'infection, justifie l'utilisation de ce critère comme facteur exprimant l'agressivité des souches.

La « durée de la période de latence » est un facteur très souvent utilisé dans d'autres pathosystèmes pour mesurer la résistance d'un cultivar (Gabriel *et al.*, 2007) ou l'agressivité d'une souche (Carlisle *et al.*, 2002). Classiquement, la durée prise en compte est souvent celle qui sépare l'infection et l'apparition des toutes premières sporulations (Gabriel *et al.*, 2007). Dans notre expérimentation, après la première pose du film plastique, certains isolats produisaient plus de 50 % de plantes avec sporulation, nous avons donc choisi le taux de 80 % afin de pouvoir comparer toutes les souches.

Les mesures de la « taille des hypocotyles » semblent pertinentes pour quantifier l'agressivité des différents isolats de *P. halstedii*. Cependant, cette capacité à modifier l'activité auxinique de la plante peut apparaître comme un facteur négatif de la « fitness ». En effet, plus le nanisme est prononcé, plus la quantité de végétal susceptible de produire de l'inoculum aérien « zoosporanges » ou la forme de conservation « oospores » est réduite (Sackston, 1981). Toutes les souches entraînent une réduction très importante de la taille des plantules, seule la souche DU1943 se distingue des autres par une réduction faible de la taille. Cette différence significative montre que toutes les souches ne disposent pas de la même agressivité.

Les corrélations observées entre les facteurs mesurés montrent qu'ils reflètent une variabilité de l'agressivité qui s'exprime par un « taux de réussite de l'infection » élevé, une « durée de la période de latence » courte, une augmentation quantitative de la sporulation et, de façon moins significative, une plus faible réduction de la taille de l'hypocotyle. Ces résultats sont comparables à ceux qui ont été trouvés par Carlisle *et al.* (2002) pour un autre oomycète : *Phytophthora infestans*, pour lequel ils montrent que les quatre mesures de l'agressivité : période de latence, fréquence d'infection, zone sous la courbe d'expansion de la lésion et capacité à sporuler sont fortement corrélées. Dans notre expérimentation, la corrélation entre « taille de l'hypocotyle », « durée de la période de latence » ($R = -0,473$) et « densité de sporulation » ($R = 0,366$) pourrait s'expliquer par une certaine spécialisation de l'agressivité vers l'invasion des tissus et la sporulation au détriment de l'activité de dérèglement de l'activité auxinique de la plante (Cohen et Sakston, 1974a).

La variabilité intra souche (entre les 5 isolats monospores) distingue nettement les souches d'origine MIL001 (pathotype 100) et MIL002 (pathotype 710) entretenues depuis de

nombreuses années, des variants récoltés en 2005 qui n'ont pas fait l'objet de multiplication en laboratoire. L'ACP montre bien la plus grande dispersion des isolats monospores issus des souches MIL 001 et MIL 002 sur l'axe F2 pour lequel le facteur « taille de l'hypocotyle » explique près de 75 % de la variabilité et le « taux de réussite de l'infection » presque 25 %. Ceci peut trouver son explication par le fait que lors de l'entretien des souches de références, ce sont de très nombreux individus qui sont multipliés à chaque cycle ce qui peut assurer une augmentation de la variabilité sur les critères non sélectionnés par le protocole de multiplication comme la réduction de la taille des plantules malades. Le nombre de cycles a été très élevé pour ces deux souches de référence, de plus, la caractéristique coenocytique du mycélium peut également participer à un brassage génétique suite à des anastomoses entre souches même en absence de reproduction sexuée (Spring et Zipper, 2006). À l'opposé, les variants analysés n'ont subi que deux cycles de multiplication depuis leur isolement sur une plantule naturellement infectée. Cependant, cette dispersion intra souche n'apparaît pas sur l'axe F1 qui est expliqué à plus de 65 % par les facteurs « durée de la période de latence » et « densité de sporulation ». La multiplication en laboratoire à l'occasion des tests de sélection qui suivent un protocole très strict (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000) conduit à sélectionner dans les populations constituant les pathotypes de référence, les individus homogènes pour la durée de la période de latence puisque l'inoculum est récupéré systématiquement après la même durée d'incubation qui est de 14 jours. Ce sont donc les individus qui sporulent le plus à 14 jours qui sont sélectionnés. Il est remarquable d'observer que les deux souches de référence MIL 001 et MIL 002 n'ont pas atteint leur maximum de sporulation après 13 jours. Le critère « taille de l'hypocotyle » n'intervient pas dans les phases de multiplication de l'inoculum. Au contraire des souches de références, les variants présentent une variabilité significative pour le critère « durée de la période de latence ». Cette variabilité, estompée lors des repiquages successifs, serait un élément important de la « fitness » : soit la souche envahit les tissus et sporule rapidement assurant une dissémination importante au niveau de la parcelle mais une mort rapide de la plantule, soit l'invasion est plus lente ce qui retarde la sporulation mais qui, en maintenant la plante en croissance plus longtemps, assure une production plus importante de la forme de conservation à l'intérieur des tissus infectés. Pour la « densité de sporulation » et à l'exception de la souche DU1943 qui présente un isolat monosporange spécifique avec une concentration en spores très élevée, il apparaît très peu de variabilité *intra* souche.

Les 7 souches se classent en deux groupes bien distincts sur les critères vitesse de sporulation (durée de la période de latence [figure 1]) et quantité de spores produites (densité de sporulation [figure 2]). L'un des groupes rassemble la souche de référence MIL 001 et les trois

variants DU 1842, DU 1767 et DU 1943 tous non virulents sur la lignée de tournesol Rha 274 qui est l'hôte différentiel D3 (Tourvieille de Labrouhe et al., 2000). L'autre groupe est composé de la souche de référence MIL 002 et des deux variants DU 1734 et DU 1915. Elle réunit les souches virulentes sur la lignée de tournesol « Rha 274 ». Ce classement laisse à penser qu'il existe un lien entre virulence et l'agressivité chez *P. halstedii*.

L'analyse génétique montre que MIL 001 et MIL 002 sont fortement différenciés (tous les allèles de la race 100 étant différents de ceux de la race 710 sauf à un marqueur) et que DU 1943 (314), DU 1734 (704) et DU 1915 (714) sont génétiquement intermédiaires entre ces deux souches. Mais, le plus remarquable, c'est la complète similitude observée entre les MIL001 (100), DU 1767 (304) et DU 1842 (300) qui ont exactement le même profil génétique. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ces deux variants sont des descendants directs de MIL 001. Les souches de profil 300 et 304 sont plus virulentes et agressives que la souche-mère de profil 100, et les deux composantes de pathogénicité sont corrélées positivement. Pour un autre Oomycète *Phytophthora infestans* sur la pomme de terre, Miller *et al.*, (1998) ont montré que les nouvelles populations étaient plus virulentes et agressives que les anciennes populations. La relation entre les deux composants du pouvoir pathogène est positive. Par contre, Sullivan *et al.*, (2005a) dans le couple de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* / tabac ont mis en évidence que la virulence et l'agressivité sont corrélées négativement. On peut donc affirmer que, contrairement à beaucoup de pathosystèmes, la capacité de *P. halstedii* à surmonter des nouveaux gènes de la résistance race spécifique *Pl* chez le tournesol (apparition de nouvelles virulences) est associée à une agressivité plus élevée.

En conclusion, ces travaux montrent l'existence au sein de l'espèce *P. halstedii*, d'une variabilité de l'agressivité, en plus des différents profils de virulence. Cependant, il apparaît clairement des groupes de comportements qui ne semblent pas indépendants des profils de virulence puisque nous distinguons clairement les pathotypes (7xx) capables d'infecter l'hôte différentiel D3, des souches non virulentes sur ce génotype de tournesol (100 et 3xx). Une étude comparative de la variabilité phénotypique et génétique réalisée sur un nombre beaucoup plus important de variants issus du mélange MIL 001 et MIL 002 (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005) devrait nous permettre d'apporter des éléments d'explication de l'évolution qualitative de la population de *P. halstedii* française qui a pour origine plusieurs introductions (Delmotte *et al.*, 2008).

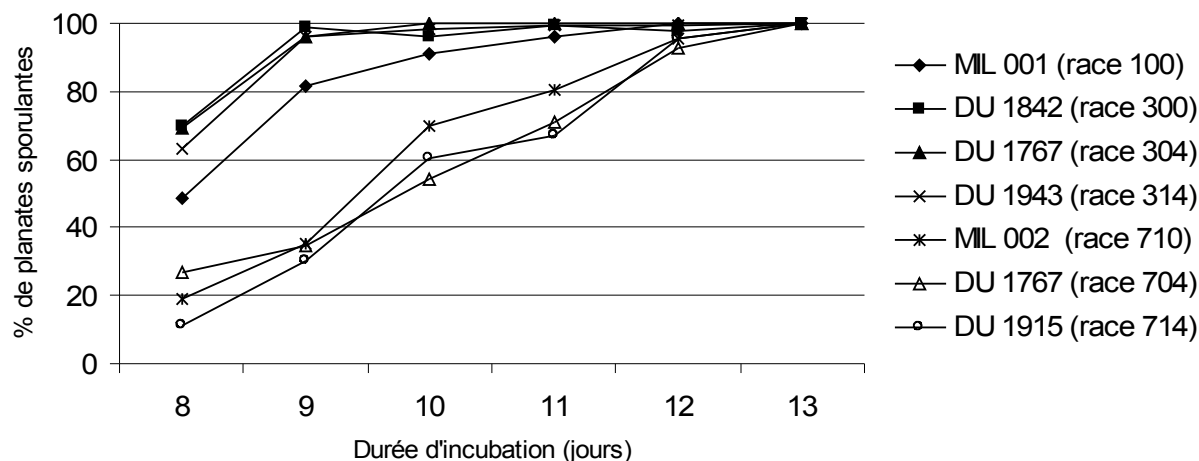


Figure 1 : Evolution du taux de sporulation sur la lignée de tournesol « FU » de 7 souches de *Plasmopara halstedii*, en fonction de la durée d'incubation.

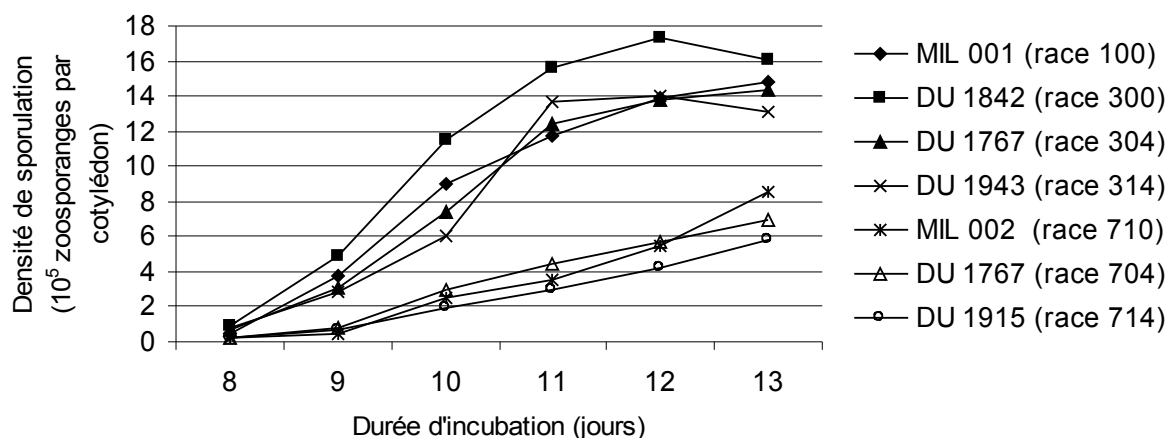


Figure 2 : Evolution de la densité de sporulation de 7 souches de *Plasmopara halstedii* sur les cotylédons de la lignée de tournesol « FU », en fonction de la durée d'incubation.

Figure 3 : Analyse en composante principale sur les données mesurées sur la lignée de tournesol FU de 4 facteurs d'agressivité sur 7 souches de *Plasmopara halstedii* (5 isolats monosporanges par souche).

TAILLE = « taille de l'hypocotyle » 13 jours après l'infection

DL = « durée de la période de latence »

DS = quantité maximum de spores produites

%INF = « taux d'infection réussie »

MIL 001 = 100

MIL 002 = 710

DU 1842 = 300

DU 1767 = 304

DU 1943 = 314

DU 1734 = 704

DU 1915 = 714

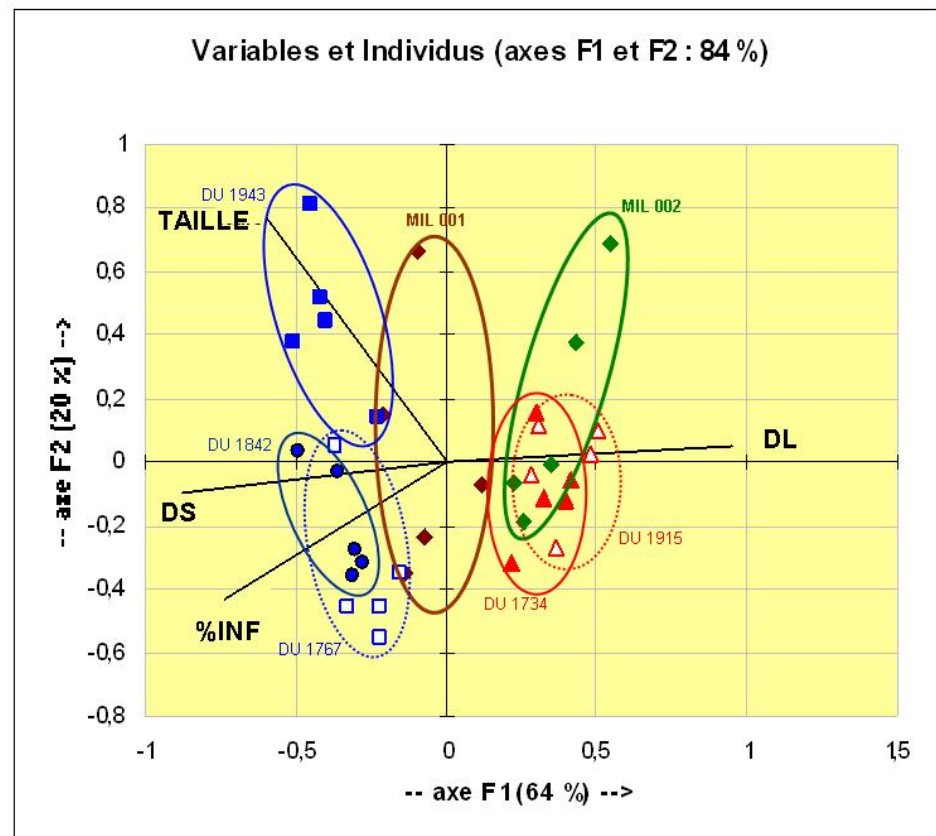


Figure 4 : Arbre basé sur des distances alléliques calculées avec 12 marqueurs EST pour 7 souches de *Plasmopara halstedii*.

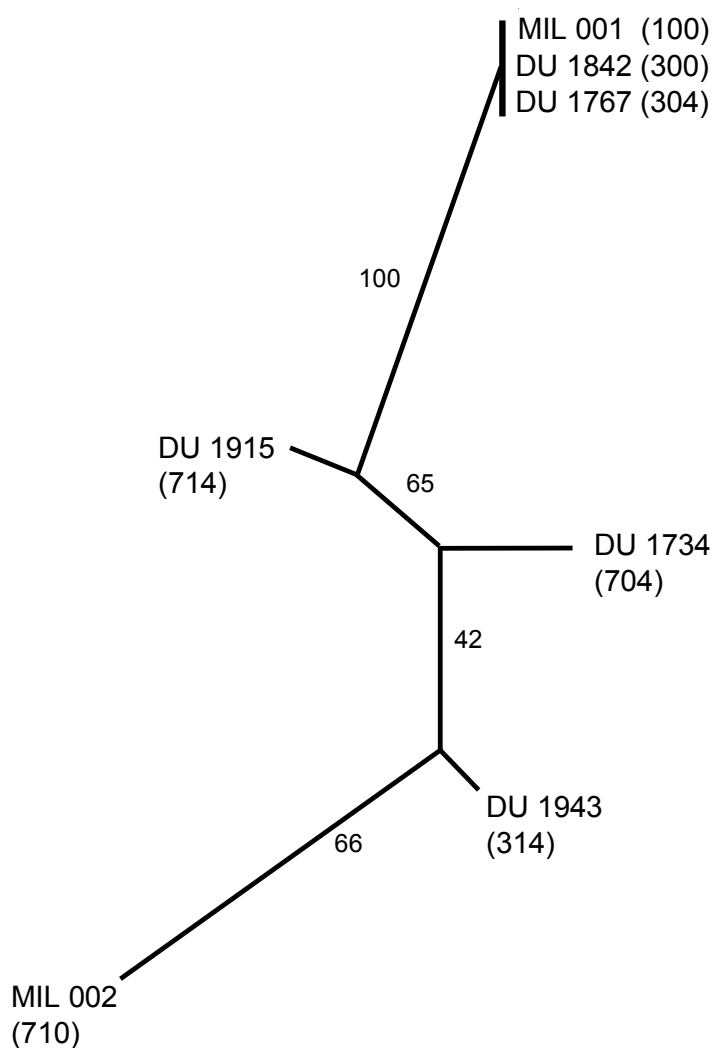


Tableau 1 : Correspondance entre nomenclature dans l'article et la déamination de isolats monozoosporanges dans la collection

Nomenclature de l'article	Nomenclature de la collection						
	MIL 001 (race 100)	DU 1842 (race 300)	DU 1767 (race 304)	DU 1943 (race 314)	MIL 002 (race 710)	MIL 1734 (race 704)	MIL 1915 (race 714)
M1	MIL001M2	DU1842M1	DU1767M1	DU1943M1	MIL002M1	DU1734M1	DU1915M1
M2	MIL001M3	DU1842M2	DU1767M2	DU1943M2	MIL002M2	DU1734M2	DU1915M2
M3	MIL001M4	DU1842M3	DU1767M3	DU1943M3	MIL002M3	DU1734M3	DU1915M3
M4	MIL001M5	DU1842M4	DU1767M4	DU1943M4	MIL002M4	DU1734M7	DU1915M5
M5	MIL001M6	DU1842M5	DU1767M5	DU1943M5	MIL002M5	DU1734M8	DU1915M6

Tableau 2 : ANOVA intra souches pour 7 souches de *Plasmopara halstedii* sur les données de mesures de l'agressivité réalisées sur la lignée de tournesol « FU » (5 isolats monosporanges par souche).

Souches	MIL001 (100)	DU1842 (300)	DU1943 (314)	DU1767 (304)	MIL002 (710)	DU1915 (714)	DU1734 (704)
Taux de réussite de l'infection							
Répétitions	3	3	3	3	3	3	3
Moyen (%)							
Isolat M1	95,0 ab	98,3	100,0	100,0	96,0	95,9	95,0
Isolat M2	100,0 a	98,8	100,0	98,9	89,6	95,5	98,3
Isolat M3	95,6 ab	98,9	99,4	100,0	90,6	95,0	95,6
Isolat M4	97,2 ab	99,4	98,9	100,0	95,6	98,3	97,8
Isolat M5	92,1 b	100,0	98,3	100,0	94,4	91,1	95,6
Probabilité							
Coefficient de Variation	2,8% 4,61%	64,7% ns 2,49%	22,6% ns 2,00%	45,0% ns 1,77%	51,43% ns 7,06%	8,1% ns 4,69%	9,3% ns 3,22%
Durée de latence							
Répétitions	3	3	3	3	3	3	3
Moyen (jours)							
Isolat M1	9,09	7,93 b	8,61 b	7,94 b	10,35	10,56 b	10,97 c
Isolat M2	9,30	8,09 b	8,53 b	8,74 a	11,76	11,85 a	10,88 c
Isolat M3	10,20	8,83 a	8,89 a	8,01 b	11,07	10,15 b	10,51 c
Isolat M4	8,93	7,82 b	8,20 c	8,59 a	10,32	11,54 a	12,48 a
Isolat M5	8,58	7,80 b	7,88 d	7,97 b	10,48	11,17 a	11,61 b
Probabilité							
Coefficient de Variation	3,6% ns 5,76%	0,0% 1,63%	0,0% 1,51%	0,0% 1,67%	6,0% ns 5,52%	0,0% 2,89%	0,0% 2,88%
Densité de sporulation							
Répétitions (blocs)	2	2	2	2	2	2	2
Moyen (nb. zoosporanges)							
Isolat M1	19,68 10 ⁵	16,61 10 ⁵	13,25 10 ⁵ b	13,04 10 ⁵	7,44 10 ⁵	6,20 10 ⁵ a	4,37 10 ⁵
Isolat M2	12,70 10 ⁵	17,20 10 ⁵	12,75 10 ⁵ b	13,60 10 ⁵	5,45 10 ⁵	3,33 10 ⁵ b	7,72 10 ⁵
Isolat M3	11,97 10 ⁵	18,33 10 ⁵	11,30 10 ⁵ b	16,26 10 ⁵	8,45 10 ⁵	3,91 10 ⁵ b	5,84 10 ⁵
Isolat M4	13,16 10 ⁵	14,03 10 ⁵	18,27 10 ⁵ a	15,31 10 ⁵	8,24 10 ⁵	4,07 10 ⁵ b	5,58 10 ⁵
Isolat M5	14,11 10 ⁵	17,42 10 ⁵	12,10 10 ⁵ b	12,32 10 ⁵	5,56 10 ⁵	7,62 10 ⁵ a	8,07 10 ⁵
Probability							
Coefficient de Variation	12,2% ns 16,13%	31,5% ns 10,63%	0,6% 5,50%	43,5% ns 15,02%	51,7% ns 29,68%	3,3% 17,42%	21,5% ns 22,66%
Taille des hypocotyles							
Répétitions moyen (mm)	3	3	3	3	3	3	3
Isolat M1	32,4 b	29,1 b	42,1 b	35,2 a	28,3 b	28,2 a	26,6 b
Isolat M2	28,7 c	28,4 b	40,9 b	27,9 b	32,8 a	28,2 ab	26,5 b
Isolat M3	28,3 c	29,0 b	35,6 d	27,6 b	29,6 b	29,6 a	26,8 b
Isolat M4	27,9 c	33,6 a	39,7 c	26,2 b	26,1 c	26,7 b	28,3 b
Isolat M5	36,8 a	35,5 a	44,9 a	27,4 b	27,4 b	25,6 c	31,0 a
Probabilité							
Coefficient de Variation	0,0 2,05%	0,00001 2,93%	0,0 1,69%	0,00008 4,42%	0,00011 2,68	0,0005 2,67%	0,00017 2,68%

a, b, c et d = groupes homogènes (test de Newman-keuls – P=0,05), ns = non significative

Tableau 3 : ANOVA inter souches pour 7 souches de *Plasmopara halstedii* sur les données de mesures de l'agressivité réalisées sur la lignée de tournesol « FU » (5 répétitions par souches correspondant à 5 isolats monosporanges)

souches	MIL 001 (100)	DU 1842 (300)	DU 1943 (314)	DU 1767 (304)	MIL 002 (710)	DU 1915 (714)	DU 1734 (704)
<u>Taux de réussite de l'infection</u>							
Moyennes (en %)	96,0	99,1	99,3	99,8	93,2	95,2	96,4
Ecart type	2,6	0,6	0,6	0,4	2,6	2,3	1,3
Groupes homogènes	B	A	A	A	B	B	B
<u>Durée de la période de latence</u>							
Moyennes (en jours)	9,22	8,09	8,42	8,25	10,80	11,06	11,29
Ecart type	0,54	0,38	0,35	0,34	0,55	0,62	0,69
Groupes homogènes	B	C	C	C	A	A	A
<u>Densité de sporulation</u>							
Moyennes (nb spores 10 ⁵)	14,32	16,72	13,53	14,10	7,03	5,02	6,31
Ecart type	2,77	1,45	2,46	1,46	1,29	1,62	1,39
Groupes homogènes	B	A	B	B	C	C	C
<u>Taille des hypocotyles</u>							
Moyennes (en mm)	30,8	31,1	40,6	28,9	28,8	27,7	27,9
Ecart type	3,4	2,9	3,1	3,2	2,3	1,4	1,7
Groupes homogènes	B	B	A	B	B	B	B

A, B, C = groupes homogènes (test de Newman-keuls – P=0,05)

Tableau 4 : Coefficients de corrélations (P = 0,05) entre les mesures des facteurs de l'agressivité de 35 isolats monosporanges de *Plasmopara halstedii*.

	Densité de sporulation	Durée de latence	Taille de l'hypocotyle	Taux de réussite de infection
Densité de sporulation	1,000	-0,840**	0,366*	0,499**
Durée de latence		1,000	-0,473**	-0,624**
Taille de l'hypocotyle			1,000	0,222 ^{ns}
Taux de réussite de l'infection				1,000

* P = 0,05

** P = 0,01

ns = non significative

Tableau 5 : Allèles de 7 souches de *Plasmopara halstedii* pour les 12 marqueurs EST. Pour chaque souche, le pathotype et les deux allèles trouvés sur chaque marqueur sont indiqués.

Souche	Rac e	EST-derived markers											
		<i>Pha</i> 6	<i>Pha3</i> 9	<i>Pha42</i>	<i>Pha43</i>	<i>Pha54</i>	<i>Pha56</i>	<i>Pha74</i>	<i>Pha79</i>	<i>Pha82</i>	<i>Pha99</i>	<i>Pha10</i> 6	<i>Pha12</i> 0
MIL 001	100	2/2	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	3/3	2/2	2/2	1/1	2/2
DU 1767	304	2/2	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	3/3	2/2	2/2	1/1	2/2
DU 1842	300	2/2	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	3/3	2/2	2/2	1/1	2/2
DU 1943	314	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	3/3	2/2	1/1	2/2	1/1
DU 1734	704	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	3/3	1/1	1/1	2/2	1/1
DU 1915	714	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	3/3	2/2	1/1	2/2	1/1
MIL 002	710	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	2/2	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1

Bilan

Les expérimentations ont mis en évidence des différences significatives entre les isolats d'une même souche et entre les différents pathotypes analysés.

Les deux principaux critères de l'agressivité, la durée de latence courte et la densité de sporulation élevée, divisent les souches en deux groupes. Le premier contient les souches de profil 100, 300, 304 et 314 et le second englobe les souches de profil 710, 704 et 714. Cette structuration semble montrer un lien étroit entre profil de virulence et agressivité. Les taux de réussite de l'infection et surtout la taille des hypocotyles montrent également une variabilité assez importante.

Dans notre hypothèse, l'agressivité la plus élevée pour une souche donnée est associée avec une densité de sporulation élevée, une durée de latence courte, un taux de réussite élevé et une réduction importante de longueur de l'hypocotyle. Dans notre expérimentation, la mesure de la surface sporulée sur les cotylédons est un critère important pour compléter les études sur l'agressivité. Cependant, ce travail nécessite des méthodes spécifiques d'analyse des images d'une part et les cotylédons doivent être exploités rapidement pour estimer la densité de sporulation d'autre part.

Les corrélations entre « taille de l'hypocotyle » et la « durée de la période de latence » ($R = -0,473$) d'une part et la « densité de sporulation » ($R = 0,366$) d'autre part, apparaissent en contradiction avec notre hypothèse qui sous-entendait que plus la souche est agressive, plus le nanisme est important. Ceci pourrait s'expliquer par une certaine spécialisation de l'agressivité vers l'invasion des tissus et la sporulation au détriment du dérèglement de l'activité auxinique de la plante.

L'analyse de la variabilité génétique des souches a mis en évidence que les trois souches des profils 100, 300 et 304 semblent avoir le même fonds génétique puisque les marqueurs utilisés ne permettent pas de les distinguer. Comme les deux souches de profil 300 et 304 sont plus virulentes et plus agressives que la souche parente 100, on peut affirmer que pour ce matériel fongique, les deux composantes du pouvoir pathogène sont corrélées positivement.

On peut donc affirmer que, contrairement à beaucoup de pathosystèmes, la capacité de *P. halstedii* à surmonter des nouveaux gènes de la résistance race spécifique *Pl* chez le tournesol est associée à une agressivité plus élevée.

Article 5

Effets des différentes méthodes de gestion des gènes *Pl* sur l'agressivité de *Plasmopara halstedii*

L'objectif de ce chapitre est d'analyser l'impact de l'utilisation des gènes de la résistance verticale sur la variabilité de l'agressivité. Les effets de la pression de sélection exercée par les génotypes du tournesol sur le pouvoir pathogène des populations de *P. halstedii* peuvent s'exercer sur les deux facteurs du pouvoir pathogène : l'agressivité et la virulence. L'évolution de la virulence a été analysée dans plusieurs études portant sur les différents modes de gestion des gènes *Pl* (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005), alors que l'évolution de l'agressivité en fonction de ces modes de gestion n'a jamais été traitée. Ceci revêt pourtant une réelle importance car un mode de gestion qui limiterait l'apparition de nouvelles virulences mais qui sélectionnerait des souches plus agressives serait contre productif dans le cadre d'une gestion globale des résistances verticale ou horizontale.

Nous avons comparé l'agressivité de trois populations de profil 710 obtenues sous différentes méthodes de gestion de gènes *Pl* : la monoculture d'une seule source de résistance, le mélange de différentes sources et leur alternance avec une population n'ayant subi aucune pression (absence de gène *Pl* efficace). Les quatre critères de l'agressivité : durée de latence, densité de sporulation, taux de plantes malades et la taille de l'hypocotyle sont analysés sur deux génotypes de tournesol présentant des niveaux différents de la résistance horizontale.

Si nous disposions d'un nombre suffisant de souches de profil 710 récoltées dans les parcelles « monoculture » et « mélange », nous ne disposions que de 3 souches isolées de la parcelle « alternance ». L'expérimentation est réalisée sur 4 souches sauf pour l'alternance (3 souches).

Ce travail fait l'objet d'une publication orale au cours de la 17^e Conférence internationale sur le tournesol.

Can management of *Pl* genes influence aggressiveness in *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew)?

Nachaat Sakr¹, Jeanne Tourvieille², Pascal Walser¹, Félicity Vear¹, Mireille Ducher², Denis Tourvieille de Labrouhe¹

¹INRA-UBP, UMR 1095, 234 Avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France, E-mail: tourvie@clermont.inra.fr

²INRA-UBP, UMR 1095, 24 Avenue des Landais, 63177 Clermont-Ferrand, France

ABSTRACT

Evolution of aggressiveness in populations of race 710 of *Plasmopara halstedii* was measured under different strategies of *Pl* gene management: mixture, alternation and monoculture of major resistance genes in comparison with a population under no selection pressure. Two sunflower lines showing different levels of non-race-specific resistance were used to measure four aggressiveness criteria: length of latent period, sporulation density, percentage infection, and hypocotyl length. The sunflower inbred line BT, rather susceptible in the field, presented a higher percentage infection, a higher sporulation density, a lower latent period and less reduced hypocotyl length than inbred line FU, which has greater resistance in the field. Differences were observed between *P. halstedii* populations under different strategies of *Pl* gene management. Strains multiplied under varietal mixtures presented the greatest sporulation densities and shortest hypocotyl lengths, those multiplied under alternation presented a reduced latent period and shorter hypocotyl lengths compared with those not influenced by selection pressure. There were no significant differences between populations multiplied under monoculture of resistance genes and those under no selection pressure. These changes appear as being linked to the number of diseased plants present. The results suggested that the method of *Pl* gene management affects aggressiveness because it determines the number of susceptible plants harboured by the parasite. Applications of these strategies of *Pl* gene management are discussed.

Key words: alternation – mixture – monoculture – pathogenicity – *Pl* gene

RESUME

L'évolution de l'agressivité des populations du profil 710 de *Plasmopara halstedii* a été mesurée sous différentes stratégies de gestion de gènes *Pl* : l'alternance, l'assemblage et la monoculture de source de la résistance en comparaison avec une population n'ayant subi aucune pression. Deux génotypes du tournesol présentant des niveaux différents de résistance non-race spécifique ont été utilisés pour mesurer quatre facteurs de l'agressivité : le taux de réussite de l'infection, la durée de latence, la densité de sporulation et la longueur de l'hypocotyle. Les souches récoltées sous les systèmes de l'alternance et de l'assemblage présentent des durées de latence les plus courtes significativement sur le génotype résistant et des longueurs de l'hypocotyle les moins grandes sur le génotype le plus sensible par rapport aux souches multipliées sous la monoculture de source résistant. De plus, les souches récoltées sous le système de l'alternance présentent des densités de sporulation plus élevées sur les deux génotypes. Cette évolution semble directement liée à la présence de nombreuses plantes malades dans ces dispositifs. Nos résultats suggèrent l'existence d'un impact du mode de gestion des gènes *Pl* sur l'évolution de l'agressivité. Seules les stratégies qui maintiennent des effectifs de la population parasitaire assez élevés permettent une évolution de l'agressivité de *P.halstedii*. Les résultats sont discutés aux regards à la mise en œuvre de ces méthodes de gestion.

Mots-clés: alternance – assemblage – monoculture – pathogénicité – *Pl* gène

INTRODUCTION

Selective effects on pathogenicity due to host resistance are an important aspect of plant-pathogen interactions, which can be divided into two parts: virulence (specific disease-causing abilities) and aggressiveness (non-specific disease-causing abilities) according to Van der Plank (1968). There have been many reports concerning increase of virulence in relation to host resistance in pathogens of economically important crops (McDonald and Linde, 2002). Similarly, Gandon and Michalakis (2000) predicted that increased levels of quantitative host resistance may select for increased aggressiveness of parasites, leading to increased crop losses. Cowger and Mundt (2002) showed that wheat cultivars with good partial resistance selected more aggressive isolates of *Mycosphaerella graminicola*. However, this is not always true, Sullivan et al. (2005) reported that tobacco cultivars with high levels of quantitative resistance did not select for more aggressive isolates of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Also, Flier et al. (2007) showed that, following large-scale introduction of more resistant potato varieties in organic production systems in Europe, there was no shift towards increased levels of aggressiveness of *Phytophthora infestans* populations.

Plasmopara halstedii (downy mildew) is a pathogen specific to sunflower, present in most areas of the world where this crop is grown. It shows physiological races (pathotypes) capable of infecting a variable range of sunflower genotypes. The nomenclature of these races is based on the reaction of a series of differential lines (Gulya et al., 1998). Race specific resistance is controlled by major genes; denoted *Pl*. Tourvieille de Labrouhe et al. (2005) showed that whatever the method of management (mixture, alternation, and monoculture) of *Pl* genes, their selection pressure led to appearance of new virulences.

This paper reports studies of levels of aggressiveness in 3 populations of *P. halstedii*, race 710, obtained under different strategies of *Pl* gene management: mixture, alternance and monoculture, in comparison with a population obtained in the absence of any effective *Pl* gene.

MATERIALS AND METHODS

Sunflower genotypes

Four quasi-isogenic hybrids were used, obtained from crosses of 2 forms each of two inbred lines:

- L1a: carrying resistance gene *Pl2*, resistant to race 100 and susceptible to race 710,
- L1b: carrying resistance genes *Pl2* and *Pl8*, resistant to races 100 and 710,
- L2a: carrying no known resistance gene,
- L2b: carrying resistance gene *Pl6*, resistant to races 100 and 710.

The four hybrids were produced as follows: H1= L1a x L2a, H2= L1a x L2b, H3= L1b x L2a and H4= L1b x L2b.

P. halstedii strains present in the soil were trapped with a sunflower hybrid (Airelle), carrying no downy mildew resistant gene. To characterise aggressiveness of *P. halstedii* strains, two inbred lines not carrying any *Pl* gene and known to have different levels of non race specific resistance (Vear et al., 2007) were studied: FU and BT.

Experimental protocol

The protocol was developed by Tourvieille de Labrouhe et al. (2005) to determine durability of resistance. Four plots constituted by netting cages were maintained with climate conditions favourable for expression of disease. Plot P1 was planted in four consecutive years with H1 (no effective resistance against race 710). Plot P2 was planted all years with an equal mixture of the four hybrids. Plot P3 was planted in first year with H1, then successively with H2, H3 and H4. Plot P4 was planted with H2, resistant to race 710, in all 4 years.

P. halstedii strains

After 4 years, *P. halstedii* strains were collected from soil according to the method described by Tourvieille de Labrouhe et al. (2008) and their virulence profile characterised by the method of Gulya et al. (1998). For plots 1, 2 and 3, four strains were analysed and for P4, 3 strains.

Measurements of aggressiveness

The protocols developed by Sakr et al (2008) were used, determining:

- Length of period between infection and sporulation on 80% of infected plants = latent period,
- Maximal sporulation density on cotyledons obtained 12 and 13 days after infection = sporulation density,
- Percentage infection = % infection,
- Hypocotyl length 13 days after infection, calculated by a percentage of the hypocotyl length of healthy plants = hypocotyl length.

All tests were carried out in growth chambers respecting European regulations (No 2003/DRAF/70).

Statistical Analyses

All statistical analyses of the phenotypic data were performed using StatBox 6.7® (GimmerSoft) software. To compare strains and genotypes, there were 2 replications for sporulation density and 3 replications for percentage

infection, latent period and hypocotyl length. To compare each characteristic in the different plots, the means of each strain were used as replications in one-way analyses of variance (ANOVA). The Newman-Keuls test was used to compare the means at $P=0.05$

RESULTS

Changes in percentage attack in the 4 plots

Data are presented in Table 1.

Table 1. Changes in downy mildew attack in 4 plots observed over 5 years.

Plots	2001 ¹	2002 ^(*)	2003 ^(*)	2004 ^(*)	2005
P1					
% diseased plants	71.5	37.4	75.4	60.3	
Number of diseased plants	203	125	215	194	
% of race 710	100	100	100	100	84.0
P2					
% diseased plants	13.9	6.5	9.9	15.1	
Number of diseased plants	43	19	33	51	
% of race 710	100	100	81.0	91.3	48.9
P3					
% diseased plants	75.2	1.1	1.5	1.1	
Number of diseased plants	236	4	5	11	
% of race 710	100	100	100	9.1	12.5
P4					
% diseased plants	2.7	1.1	4.9	14.8	
Number of diseased plants	10	4	16	52	
% of race 710	100	100	16.7	30.0	34.5

¹Tourvieille de Labrouhe et al. 2005

Table 1 shows that total numbers of diseased plants differed between plots (from 737 for plot P1 to 82 for plot P4). There was a continued reduction in percentage of *P.halstedii* samples of race 710 especially in the absence of susceptible sunflower genotypes in plots P3 and P4. Nevertheless this race was present in soil samples taken in 2005 from all plots.

Comparison of aggressiveness of 15 strains of race 710 on inbred lines FU and BT

The two sunflower lines gave a significantly different response (Table 2).

Table 2. Anova on aggressive criteria of 15 strains of *P. halstedii* measured on two sunflower lines.

% infection	Line effect			Strain effect			Interaction		
	BT	FU	Significant	Mini	Maxi	Significant	Min.	Max.	Significant
	100%	99.3%	$P<0.001$	98.6%	100%	NS	97.2%	100%	NS
Sporulation density (zoosporangia per cotyledon)	9.63 10 ⁵	7.88 10 ⁵	$P<0.001$	6.77 10 ⁵	12.64 10 ⁵	$P<0.001$	562 10 ⁵	1343 10 ⁵	NS
Latent period (days)	8.1 d.	9.0 d.	$P<0.001$	8.3 d.	8.9 d.	NS	7.8 d.	9.7 d.	NS
Hypocotyl length (% of length of healthy plants)	33.0%	40.1%	$P<0.001$	31.1%	40.3%	NS	26.7%	43.7%	NS

The inbred line BT showed a higher percentage infection, a higher sporulation density, a shorter latent period and less reduced hypocotyl length than FU. The 15 strains appeared as being homogeneous for all criteria analysed except spore density. There was no interaction between parasite strains and host genotypes.

Comparison of strain aggressiveness in each plot

Plot P4 was not distinct from P1 whereas P2 presented greater mean sporulation density and reduction in hypocotyl length, and P3 showed a shorter latent period and greater reduction in hypocotyl length (Table 3).

Table 3. Comparison of means observed for isolates from each plot compared with P1 (no effective *Pl* gene).

	% infection		Latent period (days)		Sporulation density (zoospores per cotyledon)		Hypocotyl length (% of length of healthy plants)	
	mean	reference ¹	mean	/reference ¹	mean	/reference ¹	mean	/reference ¹
P1 (reference)	99.65		8.83		8.15		40.00	
P2	99.84	NS	8.55	NS	10.89	S	35.11	S
P3	99.86	NS	8.41	S	8.30	NS	35.10	S
P4	99.09	NS	8.71	NS	7.32	NS	38.03	NS

¹Test of Newman Keuls, $P=0.05$

DISCUSSION

The presence of strains of race 710 in plots not grown with a susceptible genotype for 3 (P3) or 4 years (P4) trapped by a susceptible genotype in soil tests may be explained by the maintenance of the inoculum in the soil and/or hybrid seed impurities as isolates sampled in 2005. With the first hypothesis, the evolution of parasitic populations may depend on characters linked to fitness but independent of aggressiveness, such as their capacity to survive for a long time as oospores. With the second hypothesis, the level of susceptible seed impurities would be the important factor which intervenes in the evolution of parasitic populations.

Study of the reaction of two inbred lines to 15 strains underlined their differences in behaviour. The very good resistance of inbred line FU observed in the field was confirmed by the measurements of aggressiveness criteria described by Sakr et al. (2008). These methods can be used to characterise non-race-specific partial resistance since there were no interactions between genotypes and strains. For the 15 strains analysed, only sporulation density varied (from 1 to 2), overall, the *P. halstedii* strains appeared to be quite homogeneous.

Comparison of parasite populations isolated from the 4 plots showed that strains of race 710 from plot P4 (monoculture of *Pl6*) were not different from the population isolated from P1, with no efficient *Pl* gene. This could be explained on one hand by selection of strains which survive in the soil, independently from the factors of aggressiveness measured, or, on the other hand, by a weak level of parasitic multiplication linked to a small number of plants susceptible to race 710, thus giving incomplete expression of parasitic diversity. This second hypothesis appears most likely because the number of plants infected with race 710 was always very low in plot P4. Plot P2 was grown with a mixture of different hybrid forms, giving 25% of plants susceptible to race 710, one third of which contributed to parasitic multiplication (Table 1). Compared with plot P1, and with few infected plants, it is reasonable to suggest that isolates with a high sporulation capacity could have been favoured and may have caused the secondary infections shown by 20% of infested plants in this plot between 2001 and 2004 (Tourvieille de Labrouhe et al., 2005). These secondary infections contributed to the stock of inoculum which may explain why strains isolated from this plot showed a significantly higher sporulation density. In plot P3 (alternation), the abundant downy mildew population created in the first year, from more than 230 diseased plants, was confronted with new resistance genes every year but race 710 remained in 2005, although at a lower level than in the other 3 plots. This population evolved towards increased aggressiveness as measured by latent period. Compared with plot P4, it had a wider genetic base. Differences in aggressiveness, as compared with plot P1, were weak but significant for latent period, suggesting that, from a similar number of diseased plants, different aggressiveness factors could be selected if the number of diseased plants is small. The 2 plots that significantly differed for either latent period or sporulation density (i.e., P3 and P2) also differed for hypocotyl length.

It is commonly admitted that non-race specific partial resistance applies selection pressure on parasitic populations, which may lead to more aggressive strains. An example was maize resistance against *Cochliobolus heterostrophus* (Kolmer and Leonard, 1986). In contrast, many authors report that use of race specific resistance does not lead to modifications in aggressiveness. Sullivan et al., (2005) showed that race specific resistance in tobacco did not exert a selective effect on aggressiveness of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and in the

pathosystem *Venturia inaequalis* / apple, Parisi et al. (2004) found that virulent strains taken from cultivars carrying vertical resistance genes were highly aggressive. Since the four sunflower hybrids in the present study were isogenic except for their *Pl* genes, it appears reasonable to consider that selection pressure was mainly applied on criteria linked to virulence (Tourvieille de Labrouhe et al., 2005). The results obtained showed positive effects of certain modes of *Pl* gene management on aggressiveness factors. This effect no doubt depends more on the number of susceptible plants than on direct selection pressure of monogenic resistances. It could be suggested that management of *Pl* genes which reduce the number of susceptible plants, limits selection pressure for more aggressive strains, but increases the risk of appearance of new virulence. In contrast, management modes which lead to a non negligible number of diseased plants (mixtures and alternation), may slow down the appearance of new virulence (Tourvieille de Labrouhe et al., 2005), but could favour more aggressive strains. This conclusion must be taken into account in the choice of methods to obtain durable control of sunflower downy mildew with both race-specific and non-race-specific resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Syrian Commission of Energy Atomic for a Doctoral Scholarship favouring the first author. This work was carried out with the financial support of the ANR- Agence Nationale de la Recherche (The French National Research Agency) under the Programme Agriculture et Développement Durable, project “ANR-05-PADD-0705, Cedre”, and the French Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM).

REFERENCES

- Cowger, C., and C.C. Mundt. 2002. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* Isolates from Susceptible and Partially Resistant Wheat Cultivars. *Phytopathol.* 92:624-630.
- Flier, W.G., L.P.N.M. Kroon, A. Hermansen, H.M.G.van. Raaij, B. Speiser, L. Tamm, J.G. Fuchs, J. Lambion, J. Razzaghian, D. Andrivon, S. Wilcockson, and C. Leifert. 2007. Genetic structure and pathogenicity of populations of *Phytophthora infestans* from organic potato crops in France, Norway, Switzerland and the United Kingdom. *Plant Pathol.* 56:562-572.
- Gandon, S., and Y. Michalakis. 2000. Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proc. Royal Soc. London*, 267:985-990.
- Gulya, T.J., D. Tourvieille de Labrouhe, S. Masirevic, A. Penaud, K. Rashid, and F. Viranyi. 1998. Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). p. 130-136. In: *Proc. of the ISA Symposium. III: Sunflower Downy Mildew*. Fargo, ND, USA.
- McDonald, B.A., and C. Linde. 2002. Pathogen population genetics and the durability of disease resistance. *Euphytica* 124:163-180.
- Kolmer, J.A., and K.J. Leonard. 1986. Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn hosts with partial resistance. *Phytopathol.* 76:774-777.
- Parisi, L., V. Fouillet, H.J. Schouten, R. Groenwold, F. Laurens, F. Didelot, K. Evans, C. Fischer, F. Gennari, H. Kemp, M. Lateur, A. Patocchi, J. Thissen, and C. Tsipouridis. 2004. Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae* 663:107-113.
- Sakr, N., M. Ducher, J. Tourvieille, P. Walser, and D. Tourvieille de Labrouhe. 2007. A new method to obtain monozosporangial isolates of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Cryptogamie, Mycologie* 28:123-131.
- Sakr, N., X. Giresse, P. Walser, S. Richard-Cervera, J. Tourvieille, F. Vear, F. Delmotte, M. Ducher, and D. Tourvieille de Labrouhe. 2008. Variation of aggressiveness of different pathotypes of *Plasmopara halstedii* (agent of Sunflower Downy Mildew). Ms submitted.
- Sullivan, M.J., T.A. Melton, and H.D. Shew. 2005. Managing the race structure of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* with cultivar rotation. *Plant Disease* 89:1285-1294.
- Tourvieille de Labrouhe, D., E. Mestries, and P. Walser. 2005. Quelles perspectives pour la lutte génétique vis-à-vis du mildiou du tournesol? *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* 12:85-93.
- Tourvieille de Labrouhe, D., A. Penaud, P. Walser, E. Mestries, J. Moinard, S. Frederic, Thiery, C.B. Garric, and X. Pinochet. 2008. Determine the «sunflower downy mildew» risk by soil analysis. In: *Proc. 17th Int. Sunflower Conf.*, Cordoba, Spain. *Int. Sunfl. Assoc.*, Paris, France.
- Vanderplank, J.E. 1968. Disease resistance in plants. Academic Press, New York, USA.
- Vear, F., F. Serre, S. Roche, P. Walser, and D. Tourvieille de Labrouhe. 2007. Recent research on downy mildew resistance useful for breeding industrial-use sunflower. *Helia* 30:45-54.

Bilan

Nos résultats montrent que les souches de profil 710 ayant la même origine mais multipliées de façon différente sur 5 années (5 cycles) présentent des différences significatives au niveau de la durée de latence, de la densité de sporulation et de la réduction de longueur de l'hypocotyle.

Les souches récoltées dans le système de culture mélangeant les sources de résistance verticale présentent une densité de sporulation et une réduction de taille de l'hypocotyle plus importantes, le système de culture qui alterne les sources de résistance montre une durée de latence et une réduction de taille plus importante par rapport aux souches multipliées dans le système qui consiste à n'utiliser qu'une seule source de résistance. Cette évolution de l'agressivité au niveau de critères (la durée de latence, la densité de sporulation et la réduction de taille de l'hypocotyle) serait liée à la présence de nombreuses plantes malades dans ces dispositifs.

Nos résultats suggèrent l'existence d'un impact du mode de gestion des gènes *Pl* sur l'évolution de l'agressivité. En effet, seules les stratégies qui maintiennent des effectifs de la population parasitaire assez élevés favorisent une évolution de l'agressivité de *P. halstedii*.

Cet élément est à prendre en compte lorsque l'on propose un mode de gestion des gènes *Pl*, ainsi chaque méthode est à raisonner en fonction du gain apporté en termes de durabilité des résistances : ainsi la monoculture d'une seule source de résistance limite la pression de sélection pour plus d'agressivité, mais augmente en façon très importante le risque d'apparition de nouvelles virulences. Pour apprécier l'impact du gain d'agressivité sur la durabilité des résistances non-races spécifiques, il nous paraît très important de développer des études complémentaires sur la capacité de *P. halstedii* à surmonter ces résistances lorsqu'il y est confronté ce qui n'était pas le cas dans notre expérimentation.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La compréhension des processus de coévolution entre le parasite et son hôte est très importante, en particulier s'il s'agit d'un parasite biotrophe, ce qui est le cas pour *Plasmopara halstedii* qui ne se développe que sur le tournesol (*Helianthus annuus*) selon Orellana (1970). Cet Oomycète qui possède des gènes d'avirulence, présente une relation de type « gène pour gène » avec le tournesol qui porte des gènes de résistance verticale *Pl* (Bouzidi *et al.*, 2002). Plusieurs pathogènes possédant cette relation « gène-pour-gène » montrent une adaptation rapide à la présence de nouveaux gènes de la résistance verticale par l'apparition de nouvelles virulences surmontant ces gènes (McDonald et Linde, 2002). C'est le cas des Oomycètes : *Bremia lactuca* (Lebeda et Petrzalova, 2004), *Sclerospora graminicola* (Thakur *et al.*, 2005) et *Phytophthora infestans* (Grunwald et Flier, 2005). Il en est de même pour le mildiou du tournesol : la pression de sélection due à l'utilisation des gènes *Pl* de résistance présente une force évolutive qui entraîne une modification des virulences des populations parasites chez *P. halstedii* (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005). Les recherches sont en cours de développement pour mettre en place une stratégie de résistance durable (Vear *et al.*, 2007, 2008 ; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008).

Tourvieille de Labrouhe *et al.*, (2005) ont, sous des conditions naturelles renforcées d'infection et sous différentes pressions de sélection appliquées durant 5 années consécutives, obtenu une importante collection de souches. Celle-ci présente des souches ayant le même profil de virulence que l'une des souches d'origine (race 710) et des variants possédant de nouveaux profils de virulence. Ce matériel biologique nous a permis d'analyser les conséquences de l'apparition de nouvelles virulences sur l'agressivité ce qui correspond à notre premier objectif de travail. Dans un deuxième objectif, nous avons analysé la variabilité de l'agressivité non liée à la virulence, sur des populations (race 710) multipliées sous les différentes méthodes de gestion de gènes *Pl*. L'analyse des résultats nous permettra de valider les hypothèses sur la durabilité de la résistance verticale du tournesol gouvernée par des gènes majeurs *Pl*.

Variabilité de *P. halstedii* :

Variabilité morphologique :

L'examen de la bibliographie montre la présence de forme ovale dans les zoosporanges produits sur la partie aérienne (Nishimura, 1922 ; Hall, 1989 ; Spring *et al.*, 2003) mais aucune étude n'a porté sur la relation entre la morphologie des zoosporanges et le pouvoir pathogène chez *P.*

halstedii. Nos résultats montrent la présence de deux formes de zoosporanges : ovales et sphériques. La taille et la forme des zoosporanges dépendent des conditions de culture de champignon. La proportion des différentes formes varie en fonction du génotype de l'hôte et de l'âge des cultures. Cependant aucune relation n'a été établie entre la morphologie des zoosporanges et la virulence ou l'agressivité de *P. halstedii*. Ce paramètre ne peut pas non plus être utilisé pour différencier les races entre elles.

Variabilité de la virulence :

P. halstedii se caractérise par la présence de nombreuses races à travers le monde (Gulya, 2007). En France, la variabilité de la virulence se caractérise par la présence de races qui ne sont pas décrites ailleurs comme les races (304, 307, 314, 334, 704 et 714) issues d'une évolution *intra muros* du parasite. Cette évolution semble liée à l'utilisation exclusive des gènes de résistance verticale *PI2* et *PI6* au champ (Tourvieille de Labrouhe, 2004).

Variabilité de l'agressivité :

Aucun travail sur l'analyse de la variabilité de l'agressivité de *P. halstedii* n'a été publié. Pour notre étude, nous avons donc dû développer une méthode adaptée à la mesure de l'agressivité de notre parasite biotrophe. Cette méthode nous a permis d'estimer des facteurs largement utilisés dans plusieurs autres études. Ces critères d'agressivité ont été validés sur des génotypes du tournesol portant différents niveaux de résistance quantitative (Vear *et al.*, 2007 ; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008). Le **taux de réussite de l'infection** reflète la capacité plus ou moins grande des zoospores à pénétrer les tissus sains de l'hôte au niveau des poils absorbants de la radicelle (Delanoë, 1972). La **durée de latence** correspond à la vitesse d'apparition des symptômes sur les plantes malades. La **densité de sporulation** montre la capacité du champignon à envahir les tissus de l'hôte durant la période d'incubation. Le **nanisme** qui est un symptôme caractéristique des plantes malades, causé par une dérégulation de l'activité auxinique (IAA) dans les tissus infectés (Cohen et Sakston, 1974a), est un facteur de l'agressivité. Les facteurs d'agressivité mesurés peuvent intervenir dans la « fitness » de *P. halstedii*. En effet, plus la durée de latence sera courte et la densité de sporulation élevée, plus le champignon pourra produire un inoculum qui participera aux infections secondaires observées dans les champs (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). En ce qui concerne la réduction de la longueur de l'hypocotyle, cette capacité à modifier l'activité auxinique de la plante peut apparaître comme un facteur négatif de la « fitness ». En effet, plus le nanisme est prononcé, plus la quantité de végétal susceptible de produire de l'inoculum aérien « zoosporanges » ou la forme de conservation « oospores » est réduite (Sackston, 1981). De nombreux exemples mettent en relation l'agressivité avec le taux de réussite de l'infection, la durée de latence et la production

de spores (Miller *et al.*, 1998 ; Carlisle *et al.*, 2002 ; Bonde *et al.*, 2006) et entre la réduction de longueur de matériel végétal et l'agressivité également (Sinclair et Griffiths, 2000).

La méthode développée dans notre travail met en évidence des différences significatives entre les souches au niveau de tous les critères utilisés. Les deux principaux critères de l'agressivité, la durée de latence et la densité de sporulation, divisent les souches en deux groupes. Le premier contient les souches de profil 100, 300, 304 et 314 qui ont une durée de latence courte et qui montrent une importante sporulation et le second englobe les souches de profil 710, 704 et 714. Les taux de réussite de l'infection et surtout la taille des hypocotyles montrent également une variabilité assez importante entre les deux groupes.

Les souches présentant la plus courte durée de latence sont aussi celles qui ont la sporulation la plus élevée. Ceci pourrait s'expliquer par une invasion plus rapide des tissus par le mycélium du champignon. Les souches les plus agressives pourraient surmonter plus facilement la résistance quantitative chez le tournesol. Toutes les souches induisent une réduction de 60 % de la taille de l'hypocotyle excepté la souche DU 1943 (race 314) limitée à 50 %.

Variabilité moléculaire :

Plusieurs études ont montré la présence d'une faible variabilité moléculaire chez *P. halstedii* (Roeckel-Drevet *et al.*, 1997 ; Spring *et al.*, 2006). Cependant l'analyse des EST a permis à Delmotte *et al.*, (2008) de classer les souches françaises en trois grands groupes liés à des introductions de races étrangères différentes. Ces marqueurs appliqués à notre population parasitaire contenant différents variants (300, 304, 314, 704 et 714) issus d'un mélange initial des souches MIL 001 (race 100) et MIL 002 (race 710) (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005), nous ont permis de définir certains liens de parenté.

Nos résultats et les autres études sur la variabilité de *P. halstedii* (Roeckel-Drevet *et al.*, 1997 ; Albourie *et al.*, 1998 ; Spring et Haas, 2002 ; Spring *et al.*, 2006 ; Gulya, 2007 ; Delmotte *et al.*, 2008) montrent que *P. halstedii* possède une capacité évolutive qui lui permet de s'adapter selon McDonald et Linde (2002). Cette évolution va dépendre des pressions de sélection et des éventuels liens entre les différents facteurs du pouvoir pathogène.

La relation entre la virulence et l'agressivité chez P. halstedii :

Robinson (1976) a émis l'hypothèse que la virulence et l'agressivité étaient corrélées négativement pour un pathogène donné et plusieurs exemples sont rapportés sur cette relation dans la synthèse bibliographique (Carson, 1998 ; Sullivan *et al.*, 2005a ; Huang *et al.*, 2006 ; Murakami *et al.*, 2006). Nous avons analysé cette hypothèse sur 7 souches : 5 variants présentant un profil de virulence (races 300, 304, 314, 704 et 714) différent de celui des 2 souches d'origine (races 100 et 710).

Il est intéressant de signaler l'origine des deux souches parentes : la souche de profil 100 est d'origine européenne et la souche de profil 710 d'origine américaine (Delmotte *et al.*, 2008). Nos résultats montrent une différence d'agressivité entre ces deux souches. Est-ce que cette différence est liée à la présence de virulence différente ou à l'origine géographique des souches ? Nous ne disposons pas actuellement des éléments nécessaires pour répondre à cette question car nos analyses ont porté sur trop peu d'individus. Cependant, sur d'autres pathosystèmes (Miller *et al.*, 1998 ; Bonde *et al.*, 2006) montrent que les différences de l'agressivité sont liées aux différences de virulence, leurs analyses sont réalisées sur une large collection de souches de *Phytophthora infestans* et *Phakospora pachyrhizi* respectivement. Notre hypothèse est que le gain de virulence et l'agressivité sont corrélés négativement.

Il est possible que la différence d'agressivité et de virulence entre les deux souches d'origine : MIL 001 (race 100) et MIL 002 (race 710) soit à l'origine des différences du pouvoir pathogène retrouvées entre les variants. McDonald et Linde, (2002) ont suggéré que l'apparition de nouvelles virulences est associée avec trois types d'évènements affectant la potentialité évolutive du pathogène : la mutation, l'introduction des gènes et la reproduction sexuée. *P. halstedii* présente une reproduction sexuée (production des oospores). Dans nos conditions expérimentales (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005), nous pouvons imaginer que les variants de profils (300, 304, 314, 704 et 714) sont apparus soit par mutation des souches parentes soit par la reproduction sexuée faisant intervenir les souches parentes, soit par les deux facteurs. La pression exercée par des hybrides du tournesol sélectionne les individus les mieux adaptés qui bénéficient d'un avantage sélectif.

Avec l'ensemble des procédures mises en place dans l'expérimentation, l'introduction des souches étrangères dans les tunnels est exclue (Tourvieille de Labrouhe, comm. pers.)

Des différences significatives sont retrouvées entre les 7 souches au niveau de tous les critères de l'agressivité analysés. Ces différences permettent de rechercher une relation entre les deux composants du pouvoir pathogène chez *Plasmopara halstedii*. L'analyse de la variabilité génétique des souches a mis en évidence que celles de profils 100, 300 et 304 semblent avoir le même fond génétique puisque les marqueurs utilisés ne permettent pas de les distinguer. Comme les deux souches de profil 300 et 304 sont plus virulentes et plus agressives que la souche parente 100 on peut affirmer que, pour ce matériel fongique, les deux composants du pouvoir pathogène sont corrélés positivement. On peut donc affirmer que, contrairement au postulat de Robinson (1976) et à notre hypothèse de départ, la capacité de *P. halstedii* à surmonter le gène *Pl1* (race 300) ou les 2 gènes *Pl1* et *Pl6* (race 304) de la résistance race spécifique chez le tournesol est associée à une agressivité plus élevée. La capacité du mildiou à développer des

souches surmontant ces gènes était associée à une augmentation des deux composantes du pouvoir pathogène, nous pouvons supposer que la durabilité de la résistance assurée par ces gènes est limitée. Nos analyses du pouvoir pathogène chez les variants capables de surmonter les autres gènes de résistance comme *Pl2* (races 7xx) sont difficilement exploitables car l'analyse des liens génétiques ne montre pas de relation claire entre ces souches et une des deux souches parentes.

Pour notre pathosystème, la durabilité des résistances gouvernées par des gènes majeurs est influencée par un éventuel coût de virulence mesurable par des modifications de l'agressivité. La vitesse d'apparition de nouvelles virulences (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005) d'une part et le gain d'agressivité qui leur est associé, d'autre part, laissent à penser qu'une méthode de lutte basée sur la seule exploitation de la résistance verticale n'a pas beaucoup d'avenir pour lutter contre le mildiou du tournesol.

L'impact de l'application de différentes stratégies de gestion de gènes *Pl* sur l'agressivité de *P. halstedii* :

L'évolution du pouvoir pathogène chez les parasites est une conséquence directe des changements importants dans le niveau de résistance de leurs plantes-hôtes (Leach *et al.*, 2001 ; Mundt, 2002). Chez *P. halstedii*, l'étude de l'évolution de la virulence en fonction de la mise en œuvre d'une lutte génétique basée sur l'utilisation de gènes *Pl* a été réalisée sur des observations dans des zones de culture de tournesol (Tourvieille de Labrouhe, 2004) et sous des conditions d'infections contrôlées (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005).

Cependant, seuls les critères de virulence ont été pris en considération, qu'en est-il pour l'agressivité ?

Tout d'abord, l'examen de la bibliographie montre que la pression de sélection exercée par des résistances verticales (Parisi *et al.*, 2004) ou par des résistances horizontales (Cowger et Mundt, 2002) sélectionnent les souches les plus agressives chez *Venturia inaequalis* et *Mycosphaella graminicola*. Ils ont signalé que la pression, due aux hôtes résistants, sélectionne les individus les plus adaptés qui sont virulents sur l'hôte et également les plus agressifs.

Dans nos conditions, 3 populations de profil 710 issues de différentes stratégies de gestion de gènes *Pl* sont analysées sur deux génotypes du tournesol. Ceci nous a permis d'étudier l'évolution de leur agressivité par comparaison avec une population n'ayant subi aucune sélection liée à la présence de gène *Pl* mais obtenue dans les mêmes conditions environnementales.

La figure 11 résume les résultats obtenus : la monoculture **d'une source de résistance** limite la pression de sélection pour plus d'agressivité, mais elle augmente le risque d'apparition de

nouvelles virulences (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005). Les modes de gestion des gènes « mélange et alternance » sélectionnent des souches plus agressives tout en réduisant le taux d'apparition de nouvelles virulences (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005). Contrairement aux analyses présentées dans les études de l'évolution de l'agressivité dans la littérature, nos résultats suggèrent l'existence d'un impact indirect du mode de gestion des gènes *Pl* sur la variabilité de l'agressivité du fait du nombre des plantes malades qui hébergent le champignon et qui diffèrent selon le mode de gestion des gènes *Pl*. En effet, seules les stratégies qui maintiennent des effectifs de la population parasitaire assez élevés favorisent une augmentation de l'agressivité de *P. halstedii*.

À partir de nos résultats, l'aptitude de *P. halstedii* à développer des nouvelles agressivités en fonction des différentes méthodes de gestion de gènes *Pl* renforce le postulat de McDonald et Linde, (2002) qui dit que la pression de sélection par les hôtes joue le rôle le plus important dans la potentialité évolutive des populations parasitaires ce qui peut affecter la durabilité des résistances verticales.

En conclusion, les données acquises sur l'évolution du pouvoir pathogène dans notre laboratoire montrent que *P. hastedii* présente un challenge pour la durabilité de la résistance verticale gouvernée par des gènes majeurs *Pl* chez le tournesol cultivé. L'acquisition d'une nouvelle virulence associée à un gain d'agressivité, développé par une souche pour surmonter un gène *Pl* chez le tournesol, montre un niveau élevé d'adaptation du parasite à une pression de sélection imposée par la résistance variétale. La mise en évidence que l'apparition des nouvelles virulences, dans les populations parasitaires confrontées à de nouveaux gènes de résistance race spécifique dans les zones de culture du tournesol, peut-être associée à une augmentation de l'agressivité, rend le choix d'une stratégie durable de gestion des résistances difficile. En effet, réduire la pression de sélection sur la virulence sous-entend de maintenir une population non virulente en place ce qui favorisera l'augmentation de l'agressivité au détriment de la durabilité de la résistance.

PERSPECTIVES

Pour clarifier la relation entre les deux composantes du pouvoir pathogène chez *P. halstedii*, il sera demandé d'analyser l'agressivité sur une large collection de souches de différents profils de virulence. Cette étude devrait porter sur des souches récoltées dans différents pays, et sur une gamme de génotypes du tournesol portant différents niveaux de résistance quantitative, en réalisant les mesures de l'agressivité développées dans notre laboratoire.

Il sera intéressant de caractériser phénotypiquement les différentes souches en relation avec leur sensibilité aux fongicides. Celle-ci peut conduire à des modifications de la « fitness » des souches. L'étude de l'évolution de la résistance au fongicide pourrait permettre de comprendre les mécanismes d'émergence et de propagation de nouveaux allèles de résistances dans les populations de *P. halstedii*.

Pour préciser le rôle de la pression de gènes *Pl* dans les zones de culture de tournesol sur la variabilité de l'agressivité de *P. halstedii*, il sera demandé d'analyser des populations de même profil de virulence (par exemple, la race 710 la plus dispersée en France) récoltées à des dates et sur des régions différentes.

Des études récentes ont mis en évidence la présence de résistance quantitative chez le tournesol cultivé (Vear *et al.*, 2007 ; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008 ; Vear *et al.*, 2008). Le développement de cette résistance sur une grande surface pourrait être associé avec une augmentation de l'agressivité des populations parasites de *P. halstedii*. Il sera demandé de réaliser des analyses sur l'évolution de l'agressivité sous la pression des résistances quantitatives.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aist JR & Bushnell WR (1991) Invasion of plants by powdery mildew fungi, and cellular mechanisms of resistance. In: *The Fungal spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, edited by Cole GT & Hoch HC. New York, Plenum Press 321-345

Albourie JM, Tourvieille J & Tourvieille de Labrouhe D (1998) Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 235-242

Alfadil TA, Kiani SP, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L & Sarrafi A (2007) QTL mapping of partial resistance to *Phoma* basal stem and root necrosis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sciences* **172**: 815-823

Allard C (1978) Invasion et colonisation systémique de la plantule de tournesol (*Helianthus annuus* L.) par le *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. Et de Ton. *Annales de Phytopathologie* **10**: 197-217

Al-Saadi AM, Deadman ML, Khan I & Thacker JRM (2003) Aggressiveness of cucumber isolates of *Pythium aphanidermatum* on tomato and pepper in the Sultanate of Oman, and the relationship between aggressiveness and resistance to the fungicide metalaxyl. The BCPC International Congress: Crop Science and Technology, In: *Proceedings of the SECC, Scotland, UK*, 913-918

Andrison D, Lucas JM & Ellisseeche D (2003) Development of natural late blight epidemics in pure and mixed plots of potato cultivars with different levels of partial resistance. *Plant Pathology* **52**: 586-594

Andrivon D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbiere R, Achbani E, Pelle R & Ellisseche D (2007) Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**: 338-343

Antonovics J & Alexander HM (1989) The concept of fitness in plant-fungal pathogen systems. In: *Plant Disease Epidemiology*, edited by Leonard KJ & Fry WE, New York, McGraw-Hill, 185-214

B

Baraldi E, Mari M, Chierici E, Pondrelli M, Bertolini P & Pratella GC (2003) Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology* **52**: 362-370

Baudhuin G (2004) Epidémiologie de *Bremia lactucae* dans des cultures de laitue en association. Mémoire de stage de DESS : Elaboration et Amélioration de la Production Végétale ENITA/ Université B. Pascal Clermont –Ferrand

Bayles RA, Flath K, Hovmoller MS & de Vallavieille-Pope C (2000) Breakdown of the *Yr17* resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomy* **20**: 805-811

Bert PF, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P & Vear F (2004) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.).3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 865-874

Bert PF, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Serre F, Nicolas P & Vear F (2002) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 985-993

Blodgett JT, Kruger EL & Stanosz GR (1997) Effects of Moderate Water Stress on Disease Development by *Sphaeropsis sapinea* on Red Pine. *Phytopathology* **87**: 422-428

Blodgett JT & Stanosz GR (1997) *Sphaeropsis sapinea* morphotypes differ in aggressiveness, but both infect nonwounded red or jack pines. Plant Disease **81**:143-147

Bonde MR, Nester SE, Austin CN, Stone CL, Frederick RD, Hartman RD & Miles MR (2006) Evaluation of virulence of *Phakospora pachyrhizi* and *P. meibomia* Isolates. Plant Disease **90**: 708-716

Bosland PW & Williams PH (1988) Pathogenicity of geographic isolates of *Fusarium oxysporum* from crucifers on a differential set of crucifer seedlings. Journal of Phytopathology **123**: 63-68

Bouzidi MF, Badaoui S, Cambon F, Vear F, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P & Mouzeyar S (2002) Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. Theoretical and Applied Genetics **104**: 592-600

Brent KJ & Hollomon DW (1998) Fungicide Resistance: The Assessment of Risk, pp. 48. FRAC Monograph No.2, Global Protection Federation

Bronson CR & Ellingboe AH (1986) The influence of four unnecessary genes for virulence on the fitness of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology **76**: 154-158

Brown JKM & Mogens S (2002) Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. Science **297**: 537-541

C

Carlisle DJ, Cooke LR, Watson S & Brown AE (2002) Foliar aggressiveness of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* on detached leaflets of three potato cultivars. Plant pathology **51**: 424-434

Carson ML (1998) Aggressiveness and perennation of isolates of *Cochliobolus heterostrophus* from North Carolina. Plant Disease **82**: 1043-1047

Castro AJ, Capettini F, Corey AE, Filichkina T, Hayes PM, Kleinhofs A, Kudrna D, Richardson K, Sandoval-Islas S, Rossi C & Vivar H (2003) Mapping and pyramiding of qualitative and quantitative resistance to stripe rust in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 922-930

Chacon MG, Andrade-Piedra JL, Gessler C & Forbes GA (2007) Aggressiveness of *Phytophthora infestans* and phenotypic analysis of resistance in wild *Petota* accessions in Ecuador. *Plant Pathology* **56**: 549-561

Chisholm ST, Coaker G, Day B & Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803-814

Cohen Y & Sackston WE (1974a) Disappearance of IAA in the presence of tissues of sunflower infected by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany* **52**: 861-866

Cohen Y & Sackston WE (1974b) Seed infection and latent infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany* **52**: 231-238

Cooke LR & Deahl KL (1998) Potato blight-global changes and new problems. *Pesticide Outlook* **9**: 22-28

Cowger C & Mundt CC (2002) Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* Isolates from Susceptible and Partially Resistant Wheat Cultivars. *Phytopathology* **92**: 624-630

Crow JF (1986) *Basic Concepts in Population, Quantitative Evolutionary Genetics*, New York, Academic Press

Cruz CMV, Bai J, Ona I, Leung H, Nelson RJ, Mew T-W & Leach JE (2000) Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. In: *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13500-13505

D

Day JP & Shattock RC (1997) Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 379-391

Darvishzadeh R, Kiani SP, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L & Sarrafi A (2007) Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate nonspecific partial resistance to *Phoma macdonaldii* in sunflower. *Plant Pathology* **56**: 855-861

Delanoë D (1972) Biologie et épidémiologie du mildiou du tournesol (*Plasmopara helianthi* Novot.). *Informations Techniques CETIOM* **29** : 1-40

Delmotte F, Chen WJ, Richard-Cervera S, Greif, C, Papura D, Giresse X Mondor-Genson G & Corio-Costet MF (2006) Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes* **6**: 379-381

Delmotte F, Giresse X, Richard-Cervera S, M'Baya J, Vear F, Tourvieille J, Walser P & Tourvieille de Labrouhe D (2008) Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics, and Evolution* (in press)

Délos M, Penaud A & Meliala C (2000) Connaître l'épidémiologie du mildiou pour prévoir les risques d'attaque. In: *Le Mildiou du Tournesol*, France, Versailles : CETIOM-INRA 45-52

Delourme R, Chevre AM, Brun H, Rouxel T, Balesdent MH, Dias JS, Salisbury P, Renard M & Rimmer SR (2006) Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 41-52

Derckel JP, Baillieul F, Manteau S, Audran JC, Haye B, Lambert B & Legendre L (1999) Differential Induction of Grapevine Defences by Two Strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **89**: 197-203

De Vallavieille-Pope C (2004) Management of disease resistance diversity of cultivars of a species in single fields: controlling epidemics. *CR Biologies* **327**: 611-620

DeYoung BJ & Innes RW (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology* **7**: 1243-1249

Drenth A & Goodwin SB (1999) Population structure of Oomycetes. In: *Structure and Dynamics of Fungal Populations*, Edited by Worrall JJ. Dordrecht, the Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 195-224

Dussle CM, Hahn V, Knapp SJ & Bauer E (2004) *PlArg* from *Helianthus argophyllus* is unlinked to other downy mildew resistance genes in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1083-1086

F

Fernando WGD, Chen Y & Ghanbarnia K (2007) Breeding for Blackleg Resistance: The Biology and Epidemiology. *Advances in Botanical Research* **45**: 271-311

Flier WG, Kroon LPNM, Hermansen A, Raaij HMG van, Speiser B, Tamm L, Fuchs JG, Lambion J, Razzaghian J, Andrivon D, Wilcockson S & Leifert C (2007) Genetic structure and pathogenicity of populations of *Phytophthora infestans* from organic potato crops in France, Norway, Switzerland and the United Kingdom. *Plant Pathology* **56**: 562-572

Flier WG & Turkensteen LJ (1999) Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 381-388

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275-296

Fox DT & Williams PH (1984) Correlation of spore production by *Albugo candida* on *Brassica campestris* and visual white rust rating scale. *Canadian Journal of Plant pathology* **6**: 175-178

Fry WE, Goodwin SB, Dyer AT, Matusak JM, Drenth A, Tooley PW, Sujkowski LS, Koh YJ, Cohen BA, Spielman LJ, Deahl KL, Inglis DA & Sandlan KP (1993) Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implications. Plant Disease **77**: 653-661

G

Gabriel DW (1999) Why do pathogens carry avirulence genes? Physiological and Molecular Plant Pathology **55**: 205-214

Gabriel J, Coca A, Plata G & Parlevliet JE (2007) Characterization of the resistance to *Phytophthora infestans* in local potato cultivars in Bolivia. Euphytica **153**: 321-328

Gandon S & Michalakis Y (2000) Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. In: Proceeding of the Royal Society of London **267**: 985-990

Goker M, Voglmayr H, Riethmuller A & Oberwinkler F (2007) How do obligate parasite evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. Fungal Genetics and Biology **44**: 105-122

Gould F, Kennedy GG & Johnson MT (1991) Effects of natural enemies on the rate of herbivore adaptation to resistant host plants. Entomologia Experimentalis and Applicata **58**: 1-14

Gout L, Kuhn ML, Vincenot L, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico O, Balesdent MH & Rouxel T (2007) Genome structure impacts molecular evolution at the *AVR_{Lm1}* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. Environmental Microbiology **9**: 2978-2992

Giresse X, Tourvieille de Labrouhe D, Richard-Cervera, S & Delmotte F (2007) Twelve polymorphic EST-derived markers for *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew. Molecular Ecology Notes (in press)

Grinberger M, Kadish D & Cohen Y (1995) Infectivity of metalaxyl-sensitive and -resistant isolates of *Phytophthora infestans* to whole potato tubers as affected by tuber aging and storage. *Phytoparasitica* **23**: 165-175

Grunwald NJ & Flier WG (2005) The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 171-190

Grant MW & Archer SA (1983) Calculation of selection coefficients against unnecessary genes for virulence from field data. *Phytopathology* **73**: 547-551

Guerin F & Cam B le (2004) Breakdown of the scab resistance gene *Vf* in apple leads to a founder effect in populations of the fungal pathogen *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **94**: 364-369

Guerin F, Gladieux P & Cam, B le (2007) Origin and colonization history of newly virulent strains of the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis*. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 284-292

Gulya TJ (2007) Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Proceedings of the 2nd International Symposium on The Downy Mildews. Olemouc, July 2007, République Tchèque

H

Hall G (1989) CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, Set 98, Nos. 971-980. *Mycopathologia* **106**:183-211

Hand P, Kift N, McClement S, Lynn JR, Grube R, Schut JW, Arend AJM van der & Pink DAC (2003) Progress towards mapping QTLs for pest and disease resistance in lettuce. In: Proceedings of the EUCARPIA. Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding, Netherlands, 31-35

Harrington TC, Steimel J, Workneh F & Yang XB (2003) Characterization and distribution of two races of *Phialophora gregata* in the north-central United States. *Phytopathology* **93**: 901-912

Heiser CB (1976) The sunflower. University of Oklahoma press

Henry LM, Roitberg BD & Gillespie DR (2008) Host-range evolution in *Aphidius parasitoids*: fidelity, virulence and fitness trade-offs on an ancestral host. *Evolution* **62**: 689-699

Hooftman DAP, Nieuwenhuis BPS, Posthuma KI, Oostermeijer JGB & Nijs HCM den (2007) Introgression potential of downy mildew resistance from lettuce to *lactuca serriola* and its relevance for plant fitness. *Basic and Applied Ecology* **8**: 135-146

Huang YJ, Li ZQ, Evans N, Rouxel T, Fitt BDL & Balesdent MH (2006) Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 77-89

I

Ioos R, Laugustin L, Rose S, Tourvieille J & Tourvieille de Labrouhe D (2007) Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathology* **56**: 209-218

Iriarte FB, Wetzel HC III, Fry JD, Martin DL & Tisserat NA (2004) Genetic diversity and aggressiveness of *Ophiosphaerella korrae*, a cause of spring dead spot of bermudagrass. *Plant Disease* **88**: 1341-1346

J

Jin L & Chakraborty R (1993) Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 1112-1114

Johnson R (1981) Durable resistance: Definitions of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* **71**: 567-568

Johnson R (1984) A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **22**: 309-330

Joosten MHAJ, Cozijnsen TJ & de Wit PJGM (1994) Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* **367**: 384-386

Joosten MHAJ & deWit PJGM (1999) The tomato- *Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 335-367

K

Kinman ML (1970) New developments in the USDA and State Experiment Station sunflower breeding programs. In: Proc. 4th. Int. Sunflower Conf. USA, Tennessee, Memphis 181-183

Knapova G & Gisi U (2002) Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology* **51**: 641-653

Kolb FL, Bai GH, Muehlbauer GJ, Anderson JA, Smith KP & Fedak G (2001) Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: mapping and manipulation with molecular markers. *Crop Science* **41**: 611-619

Kolmer JA (1993) Selection in a heterogeneous populations of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*. *Phytopathology* **83**: 909-914

Kolmer JA & Leonard KJ (1986) Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn hosts with partial resistance. *Phytopathology* **76**: 774-777

Kover PX & Schaal BA (2002) Genetic variation for disease resistance and tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. In: Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. **99**: 11270-11274

L

Lafon S, Penaud A, Walser P, De Guenin MC, Molinero V, Mestries R & Tourvieille de Labrouhe D (1996) Le mildiou du tournesol toujours sous surveillance. *Phytoma – La Défense des Végétaux* **484**: 35-36

Langella O (1999) Populations 1.2.28 software. (<http://www.pge.cnrs-gif.fr/bioinfo/populations>)

Leach JE, Cruz CMV, Bai J & Leung H (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 187-224

Lebeda A & Petzelova I (2004) Variation and distribution of virulence phenotypes of *Bremia Lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. *Plant pathology* **53**: 316-324

Lebreton L, Lucas P, Guillermin AY & Sarniguet A, (2004) Effet de cultures successives de blé et de traitement fongicides répétés sur la structure des populations de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, agent du piétin-échaudage du blé, à une échelle locale. Ve rencontres de phytopathologie/mycologie, Aussois (France)

Leclercq P (1969) Une stérilité cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plant.* **19**: 99-106

Leonard KJ (1969) Selection in heterogeneous populations of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. *Phytopathology* **59**: 1851-1857

Leonard KJ (1977) Virulence, temperature optima, and competitive abilities of isolines of races T and O of *Bipolaris maydis*. *Phytopathology* **67**: 1273-1279

Leonard KJ (2003) Regional frequencies of virulence in oat crown rust in the United States from 1990 through 2000. *Plant Disease* **87**: 1301-1310

Leonard KJ (2007) Persistent virulence associations in sexual populations of *Puccinia coronata*. *Plant Pathology* **56**: 35-45

Lindhout P (2002) The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable resistance. *Euphytica* **124**: 217-226

M

McDonald BA & Linde C (2002) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* **124**: 163-180

McDowell JM & Simon SA (2006) Recent insights into R gene evolution. *Molecular Plant Pathology* **7**: 437-448

McIntosh RA & Brown GN (1997) Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 311-326

Meliala C (2001) Biologie du *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. Et de Toni, agent du mildiou du tournesol (*Helianthus annuus* L.) Thèse de Docteur de l'Université Blaise Pascal, DU 1266, France, Clermont-Ferrand

Mestries E, Gentzbittel D, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P & Vear F (1998) Analysis of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Molecular Breeding* **4**: 215-226

Miller JS, Johnson DA & Hamm PB (1998) Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology* **88**: 190-197

Minamiyama Y, Tsuru M, Kubo T & Hirai M (2007) QTL analysis for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper using a high density SSR-based map. *Breeding Science* **57**: 129-134

Moerschbacher BM & Reisener HJ (1997) The hypersensitive resistance reaction. In: *Resistance of crop plants against fungi*, Edited by Hartleb H, Heitefuss R & Hoppe HH. Germany, Lübeck & Ulm, Gustav Fischer, Jean, Stuttgart, 126-158

Molinero-Demilly V, Walser P, Giroult C, Herbert O, Guenard M & Tourvieille de Labrouhe D (2005) Mise au point d'une méthode de conservation à long terme de *Plasmopara halstedii*, parasite obligatoire, agent du mildiou du tournesol. *Cryptogamie, Mycologie* **26**: 189-194

Montarry J, Corbiere R & Andrivon D (2007) Is there a trade-off between aggressiveness and overwinter survival in *Phytophthora infestans*? Functional Ecology **21**: 603-610

Montarry J, Corbiere R, Lesueur S, Glais I. & Andrivon D (2006) Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systemes? Journal of Evolutionary Biology **19**: 522-531

Mundt CC (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. Annual Review of Phytopathology **40**: 381-410

Munk L, Jensen HP & Jorgensen JH (1991) Virulence and severity of barley powdery mildew in Denmark 1974-89. In: Proceedings of the 2nd European Workshop on Integrated Control of Cereal Mildews, Virulence Patterns and Their Change, Roskilde, Denmark

Murakami J, Hau VTB, Mayama S & Tosa Y (2006) Reduction in aggressiveness among hybrids between host-specific pathotypes of *Magnaporthe oryzae* is caused by reduced ability to overcome adult resistance at the level of penetration. Journal of General Plant Pathology **72**: 284-291

N

Newton MR, Wright AS, Kinkel LL & Leonard KJ (1999) Competition alters temporal dynamics of sporulation in the wheat stem rust fungus. Journal of Phytopathology **147**: 527-534

Niks RE (1983) Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistant, and nonhost plant genotypes. Phytopathology **73**: 64-66

Niks RE & Dekens RG (1991) Prehaustorial and posthaustorial resistance to wheat leaf rust in diploid wheat seedlings. Phytopathology **81**: 847-851

Nishimura M (1922) Studies in *Plasmopara halstedii*. I. The infection of *Helianthus annuus* L. by zoospores. J. Coll. Agric. Hokkaido Imp. Univ. XL **3**: 185-216

Novotelnova NS (1966) Downy mildew in sunflower. USSR, Nauka AS, Moscow

O

Orellana RG (1970) Resistance and susceptibility of sunflowers to downy mildew and variability in *Plasmopara halstedii*. Bull. Of Torrey Botanical Club **97**: 91-97

Oros G & Viranyi F (1987) Glasshouse evaluation of fungicides for the control of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*). Ann. Appl. Biol. **110**: 53-63

P

Parlevliet JE (1993) What is durable resistance, a general outline. In: *Durability of Disease Resistance*, Edited by Jacobs TH & Parlevliet JE. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 23-39

Parlevliet JE (2002) Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. Euphytica **124**: 147-156

Parisi L, Fouillet V, Schouten HJ, Groenwoil R, Laurens F, Didelot F, Evans K, Fischer C, Gennari F, Kemp H, Lateur M, Patocchi A, Thissen J & Tsipouridis C (2004) Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. Acta Horticulturae **663**:107-113

Peever TL, Liu YC, Cortesi P & Milgroom MG (2000) Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interactions. Applied and Environmental Microbiology **66**: 4863-4869

Penaud A, Lafon S, Tourvieille J, Molinero V, Delos M, De Guenin MC, Walser P & Tourvieille de Labrouhe D (1997) Evolution du tournesol du tournesol en France. Compte-rendu de la 5^{ème} Conférence International sur les Maladies des Plantes, France, Tour 407-412

Pietravalle S, Lemarie S & Bosch F van den (2006) Durability of resistance and cost of virulence. European Journal of Plant Pathology **114**: 107-116

Pringle A & Taylor JW (2002) The fitness of filamentous fungi. Trends in Microbiology **10**: 474-481

R

Radwan O (2004) Analyse moléculaire des mécanismes de résistance du tournesol à l'agent du mildiou *Plasmopara halstedii* contrôlés par le locus *PL5/PL8*. Thèse de Docteur de l'Université Blaise Pascal, DU 1524, France, Clermont-Ferrand

Rapilly F (1991) L'épidémiologie en pathologie végétale : mycoses aériennes. INRA, France, Paris

Raposo R, Delcan J, Gomez V & Melgarejo P (1996) Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. Plant Pathology **45**: 497-505

Rachid Al-Chaarani A, Roustae L, Gentzbittel L, Mokrani G, Barrault G, Dechamp-Guillaume G & Sarrafi A (2002) A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines. Theoretical and Applied Genetics **104**: 490-496

Regnault Y & Tourvieille de labrouhe D (1991) Mildiou "Les maladies du tournesol". Les points techniques du CETIOM 30-36

Rep M (2005) Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. FEMS Microbiology Letter **253**: 19-27

Ridout CJ, Skamnioti P, Porritt O, Sacristan S, Jones JDG, Brown JKM (2006) Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. Plant Cell **18**: 2402-2414

Riethmuller A, Voglmayr H, Goker M, Weiss M & Oberwinkler F (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **94**: 834-849

Rimé D, Robert C, Goyeau H & Lannou C (2005) Effect of host genotype on leaf rust (*Puccinia triticina*) lesion development and uredinispore production in wheat seedling. *Plant Pathology* **54**: 287-298

Robinson RA (1976) *Plant Pathosystems*. New York, Academic press

Roeckel-Drevet P, Coelho V, Tourvieille J, Nicolas P & Tourvieille de Labrouhe D (1997) Lack of genetic variability in French Identified races of *Plasmopara halstedii*, the cause of downy mildew in sunflower *Helianthus annuus*. *Canadian Journal of Microbiology* **43**: 260-263

Roeckel-Drevet P, Tourvieille J, Drevet JR, Says-Lesage V, Nicolas P & Tourvieille de Labrouhe D (1999) Development of a polymerase chain reaction diagnostic test for the detection of the biotrophic pathogen *Plasmopara halstedii* in sunflower. *Canadian Journal of Microbiology* **45**: 797-803

Roeckel-Drevet P, Tourvieille J, Gulya TJ, Charmet J, Nicolas P & Tourvieille de Labrouhe D (2003) Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Canadian Journal of Microbiology* **49**: 492-502

Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J & Balesdent MH (2003) A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 871-881

S

Sackston WE (1981) Downy mildew of sunflower. In: *The downy mildew* (D.M. Spencer, ed). Academic Press, UK, London 545-575

Sacristan S, Frail A, Malpica JM & Garcia-Arenal F (2005) An analysis of host adaptation and its relationship with virulence in Cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **95**: 827-833

Sakr N, Ducher M, Tourvieille J, Walser P & Tourvieille de Labrouhe D (2007) A new methode to obtain monozoosporangial isolates of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Cryptogamie, Mycologie* **28**: 123-131

Schouten HJ & Beniers JE (1997) Durability of resistance to *Globodera pallida* I. Changes in pathogenicity, virulence, and aggressiveness during reproduction on partially resistant potato cultivars. *Phytopathology* **87**: 862-867

Sinclair WA & Griffiths HM (2000) Variation in Aggressiveness of Ash Yellows Phytoplasmas. *Plant Disease* **84**: 282-288

Sliwka J, Wasilewicz-Flis I, Jakuczun H & Gebhardt C (2008) Tagging quantitative trait loci for dormancy, tuber shape, regularity of tuber shape, eye depth and flesh colour in diploid potato originated from six *Solanum* species. *Plant Breeding* **127**: 49-55

Smith DR & Stanosz GR (1995) Confirmation of two distinct populations of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States using RAPDs. *Phytopathology* **85**: 699-704

Spring O, Bachofer M, Thines M, Riethmuller A, Goker M & Oberwinkler F (2006) Intraspecific relationship of *Plasmopara halstedii* isolates differing in pathogenicity and geographic origin based on ITS sequence data. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 309-315

Spring O & Haas K (2002) The fatty acid composition of *Plasmopara halstedii* and its taxonomic significance. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 263-267

Spring O, Rozynek B & Zipper R (1998) Single Spore Infections with Sunflower Downy Mildew. *Journal of Phytopathology* **146**: 577-579

Spring O, Voglmayr H, Riethmuller A & Oberwinkler F (2003) Characterization of a *Plasmopara* isolate from *Helianthus x laetiflorus* based on cross infection, morphological, fatty acids and molecular phylogenetic data. *Mycological Progress* **2**: 163-170

Spring O & Zipper R (2006) Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycological Research* **110**: 657-663

Suassuna ND, Maffia LA & Mizubuti ESG (2004) Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **53**: 405-413

Sullivan MJ, Melton, TA & Shew HD (2005a) Fitness of races 0 and 1 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Disease* **89**: 1220-1228

Sullivan MJ, Melton, TA & Shew HD (2005b) Managing the race structure of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* with cultivar rotation. *Plant Disease* **89**: 1285-1294

Swart WJ, Wingfield MJ (1991) Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on Pinus species in South Africa. *Plant Disease* **75**: 761-766

T

Thakur RP, Rao VP, Wu BM, Subbarao KV, Shetty HS, Singh G, Lukose C, Panwar MS, Sereme P, Hess DE, Gupta SC, Dattar VV, Panicker S, Pawar NB, Bhangale GT & Panchbhai SD (2004) Host resistance stability to downy mildew in pearl millet and pathogenic variability in *Sclerospora graminicola*. *Crop Protection* **23**: 901-908

Thrall PH, Barrett LG, Burdon JJ & Alexander HM (2005) Variation in pathogen aggressiveness within a metapopulation of the *Cakile maritima* - *Alternaria brassicicola* host-pathogen association. *Plant Pathology* **54**: 265-274

Tourvieille de Labrouhe D (2004) Faire durer la résistance au mildiou du tournesol. *Rencontres Annuelles du CETIOM, Paris (France)*, 67-73

Tourvieille de Labrouhe D, Champion R, Vear F, Mouzeyar S & Said J (1988) Une nouvelle race de mildiou en France- identification, test de contrôle. Informations Techniques CETIOM **104**: 3-10

Tourvieille de Labrouhe D, Mestries E & Walser P (2005) Quelles perspectives pour la lutte génétique vis-à-vis du mildiou du tournesol ? Oléagineux, Corps Gras, Lipides **12**: 85-93

Tourvieille de Labrouhe D, Pilorge E, Nicolas P & Vear F (2000) Le mildiou du tournesol. CETIOM, INRA Editions

Tourvieille de Labrouhe D, Serre F, Walser P, Roche S & Vear F (2008) Non-race-specific resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). in press

Tourvieille de Labrouhe D, Vear F & Habouzit J (1986) Culture du tournesol sous tunnel en filet avec humectation contrôlée pour l'étude du *Sclerotinia sclerotiorum*. Informations Techniques CETIOM **96**: 20-28.

Tourvieille de Labrouhe D & Walser P (2005) Un test simple pour déceler la présence du mildiou sur une parcelle. Oleoscope **83**: 12

Turkington TK, Clayton GW & Woods DL (2000) The impact of soil incorporation of canola residues and stubble application of chemicals on decomposition and inoculum production by *Leptosphaeria maculans*. Canadian Journal of Plant Pathology **22**: 155-159

V

Van der Plank JE (1963) Plant Diseases: Epidemics and Control. New York, Academic press

Van der Plank JE (1968) Disease resistance in plants. New York and London, Academic press

Vear F (1992) Le tournesol. In objectifs de critères de sélection des espèces végétales cultivées. INRA, éditions 146-160

Vear F, Serre F, Jouan-Dufournel I, Bert PF, Roche S, Walser P, Tourvieille de Labrouhe D & Vincourt P (2008) Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). Submitted

Vear F, Serre F, Roche S, Walser P & Tourvieille de Labrouhe D (2007) Recent research on downy mildew resistance useful for breeding industrial – use sunflowers. *Helia* **30**: 45-54

Vear F, Tourvieille de Labrouhe D & Miller JF (2003) Inheritance of the wide-range downy mildew resistance in the sunflower line Rha419. *Helia* **26**: 19-24

Viljanen-Rollinson SLH, Gaunt RE, Frampton CMA, Falloon RE & McNeil DL (1998) Components of quantitative resistance to powdery mildew (*Erysiphe pisi*) in pea (*Pisum sativum*) *Plant Pathology* **47**: 137-147

Villareal LMMA & Lannou C (2000) Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population. *Phytopathology* **90**: 1300-1306

Viranyi F (1988) Factors affecting oospore formation in *Plasmopara halstedii*. Proceedings of the 12th International Sunflower Conference, Novi Sad **2**: 32-37

Vranceanu AV & Stoenescu F (1970) Immunity to sunflower downy mildew due to a single dominant gene. *Probleme Agricole* **2**: 34-40

W

Walker JC (1930) Inheritance of *Fusarium* resistance in Cabbage. *J. Agric. Res* **40**: 721-745

Wellings CR & McIntosh RA (1990) *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* in Australasia: pathogenic changes during the first 10 years. *Plant pathology* **39**: 316-325

Z

Ziogas BN, Markoglou AN & Malandrakis AA (2003) Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 311-317

ANNEXE

Validation des conditions de culture

Van der Plank (1963, 1968) a signalé que l'agressivité du parasite peut être influencée par les conditions climatiques.

Afin de s'assurer que toutes nos analyses de l'agressivité sont réalisées dans des conditions homogènes, nous avons contrôlé la température, l'humidité et l'intensité lumineuse de nos chambres et vérifié l'homogénéité de la croissance des plantes quelles que soient la chambre de culture et la période d'expérimentation.

I – Paramètres physiques:

L'analyse de l'agressivité des souches de *P. halstedii* est réalisée dans les trois chambres de culture P3 de février 2006 à novembre 2007. Tous les tests pour mesurer l'agressivité sont réalisés dans des enceintes de confinement aux normes sanitaires de niveau 3, ayant reçu l'agrément « parasites de quarantaine » (figure 1). Ces enceintes sont constituées de compartiments de 1 m² éclairés (16h/24h) par 12 tubes fluorescents de 1m20 (Philips 36 W super 80 new generation G13) soit une intensité lumineuse de 60 photons de micro mol m⁻² s⁻¹. Les cultures sont en permanence balayées par un air filtré (dop : 99,9) régulé à 18 °C ± 1 (tableau 1 et figure 2) avec une humidité relative variant de 65 à 90 %. Les conditions climatiques des trois chambres de culture sont contrôlées par l'équipe Serre à l'INRA de Clermont-Ferrand.

La durée de vie des tubes fluorescents est de 5 années mais ils sont remplacés chaque année.



Figure 1 : Enceinte de culture P3 utilisée pour étudier *P. halstedii*.

Tableau 1 : Moyennes des températures mensuelles pour les années 2006 et 2007 (14400 lectures enregistrées) dans les chambres P3

Date de l'expérimentation	Chambre 22	Chambre 23	Chambre 24
02/06	17,36±0,03	17,38±0,02	17,80±0,03
03/06	17,35±0,03	17,41±0,02	17,81±0,03
04/06	17,24±0,03	17,42±0,03	17,75±0,03
05/06	17,11±0,04	17,41±0,03	17,63±0,03
06/06	17,23±0,04	17,78±0,03	17,70±0,03
08/06	17,34±0,03	17,47±0,03	17,74±0,02
09/06	17,34±0,03	17,50±0,03	17,67±0,02
10/06	17,17±0,08	17,69±0,07	17,80±0,08
12/06	17,51±0,03	17,52±0,03	17,90±0,03
01/07	17,45±0,03	17,54±0,03	17,86±0,03
02/07	17,42±0,04	17,53±0,03	17,82±0,02
03/07	17,40±0,06	17,54±0,02	17,83±0,06
04/07	17,39±0,05	17,48±0,05	17,78±0,06
05/07	17,50±0,05	17,43±0,12	17,91±0,03
08/07	17,81±0,03	17,81±0,03	17,79±0,02
09/07	17,93±0,02	17,50±0,02	17,88±0,02
10/07	17,88±0,02	17,51±0,01	17,93±0,03
11/07	17,97±0,04	17,52±0,02	17,97±0,04

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de signification de 0.05%.

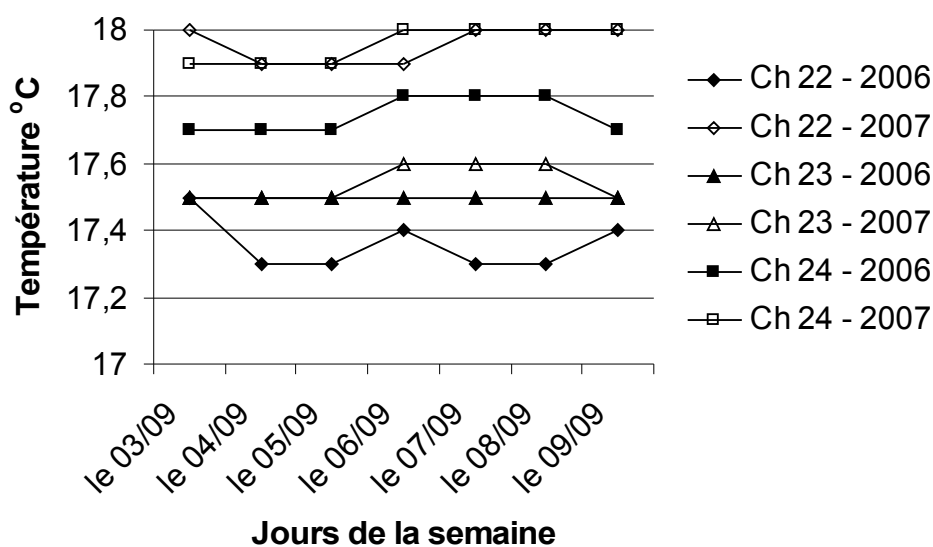


Figure 2 : Températures mesurées la 1^{re} semaine des mois de septembre 2006 et 2007 dans les trois chambres P3.

Ces résultats montrent une stabilité de la température dans les 3 chambres de culture P3 tant du point de vue journalier que mensuel ou annuel. Les différences expérimentales, éventuellement mesurées, ne seront pas influencées par ce paramètre.

II – Paramètres biologiques

Plusieurs tests biologiques ont été réalisés dans les chambres P3. Afin de s'assurer que la date et le lieu d'expérimentation ne modifiaient les résultats expérimentaux et permettaient de les répéter dans les différentes chambres et à différentes dates, la mesure de la longueur de l'hypocotyle a été retenue comme critère. Les mesures sont réalisées soit sur des plantules saines, soit sur des plantules infectées par une souche de *P. halstedii*

II – 1 - Tests réalisés sur des plantules saines

Le génotype (FU, utilisé pour mesurer l'agressivité) est semé dans les trois chambres de culture en même temps au mois de mai 2007 et août 2007. Une terrine avec 3 répétitions de 10 plantes est placée dans chacune des chambres. La taille de l'hypocotyle est mesurée 13 jours après la plantation. Les résultats sont présentés dans le tableau 2. Pour les tests sur la longueur de l'hypocotyle sans infection ; la méthode de randomisation totale avec un seul facteur (le génotype) avec trois répétitions a été utilisée pour traiter les données.

Tableau 2 : Moyenne des longueurs (en mm) des hypocotyles de plantules du génotype FU dans trois chambres de culture et à deux dates différentes.

Chambres de culture	Dates d'expérimentation	
	Mai 2007	Août 2007
Chambre 22	88,6±2,55 a	90,1±2,43 a
Chambre 23	88,10±2,35 a	90,32±3,63 a
Chambre 24	91.5±2,38 a	92,5±2,48 a

Valeurs dans la même colonne avec la même lettre non significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ($P= 0.05$), les intervalles de confiance sont calculés au seuil de signification de 0.05%.

Influence des dates d'expérimentation :

Les trois génotypes (FU, BT et GB utilisés pour mesurer l'agressivité) sont semés à différentes dates (3 répétitions de 10 plantes). La taille de l'hypocotyle des plantules est mesurée 13 jours après le semis. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Moyennes des longueurs des hypocotyles (en mm) des plantules des trois génotypes de tournesol à différentes dates d'expérimentation.

Dates d'expérimentation	Génotypes du tournesol		
	FU	BT	GB
Février 2007	90±2,31 a (Ch 22)*		
Mai 2007	88,10±2,35 a (Ch 23)		56,26±2,36 a (Ch 24)
Août 2007	92,5±2,48 a (Ch 24)	91,62±2,09 a (Ch 22)	55,33±3,94 a (Ch 24)
Novembre 2007		88,6±2,6 a (Ch 22)	

Valeurs dans la même colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (P=0.05), les intervalles de confiance sont calculés au seuil de signification de 0.05%, * valeur correspondant à chambre de culture

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas d'influence de la chambre de culture ni de la période d'expérimentation sur la taille de l'hypocotyle. Les différences mesurées au cours des expériences seront indépendantes de ces facteurs.

II – 2 - Tests réalisés sur des plantules infectées

Les quatre mesures de l'agressivité de la souche DU 1555 ont été étudiées à deux dates différentes ; la première en janvier 2007 et la deuxième date en mai 2007 (tableau 4). Pour comparer les deux séries de données, nous avons utilisé les analyses statistiques présentées dans la partie de matériels et méthodes (page 36).

Tableau 4 : Valeurs des 4 critères de l'agressivité de la souche de *P. halstedii* DU 1555 mesurés sur la lignée de tournesol FU à deux dates différentes

Critère de l'agressivité	Dates d'expérimentation	
	Janvier 2007	Mai 2007
Durée de latence (jours)	9,12 a	9,26 a
Densité de sporulation (10 ³ zoosporanges par cotylédon)	561,5 a	602,0 a
Taux de réussite de l'infection (%)	98,89 b	100 a
Longueur de l'hypocotyle (mm)	39,6 a	40,1 a

Valeurs dans la même ligne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (P=0.05), les intervalles de confiance sont calculés au seuil de signification de 0.05%.

Les résultats montrent qu'il n'existe pas de différences significatives au niveau de tous les critères de l'agressivité sauf pour le taux de réussite de l'infection. Cependant ce facteur semble ne pas dépendre des conditions d'incubation mais plutôt des conditions d'infections.

Les résultats montrent qu'il n'existe pas de différences tant au niveau des chambres de culture qu'au niveau des différentes dates d'expérimentation.

Sur les plantules infectées on observe la présence de sporulation au niveau des cotylédons, alors que les plantules non infectées ne présentent aucun de ce symptôme.

Les analyses réalisées pour étudier l'agressivité sur du matériel végétal vivant chez *Phytophthora infestans* / pomme de terre (Knapova et Gisi, 2002 ; Montarry *et al.*, 2006) et chez *Phakopsora pachyrhizi* / soja (Bonde *et al.*, 2006) montrent que **le paramètre permettant de valider le test d'analyse de l'agressivité est la stabilité des conditions climatiques dans les chambres de cultures contrôlées. Nous avons vérifié ce paramètre dans notre expérimentation.**

RESUME

Afin de mieux comprendre les interactions entre *Plasmopara halstedii* et le tournesol, nous nous sommes intéressés à la variabilité du pouvoir pathogène du parasite. Sur une population locale de *P. halstedii* obtenue sous des conditions naturelles renforcées d'infection et sous différentes pressions de sélection appliquées durant 5 années consécutives, nous avons analysé les liens existants entre l'apparition de nouvelles virulences et l'agressivité d'une part, la variabilité de l'agressivité de populations de la race 710 multipliées sous les différentes méthodes de gestion de gènes *Pl*, d'autre part.

Deux méthodes ont été développées au cours de notre travail :

- * la première pour obtenir des isolats mono zoosporanges afin d'étudier la variabilité *intra* et *inter*-pathotype,
- * la deuxième pour mesurer l'agressivité.

Quatre critères de l'agressivité : le taux de réussite de l'infection, la durée de latence, la densité de sporulation et la diminution de taille de l'hypocotyle, ont été analysés sur trois génotypes du tournesol présentant différents niveaux de résistance quantitative. La durée de latence et la densité de sporulation classent les souches en deux groupes selon leur agressivité. Cependant, le taux de réussite de l'infection et la réduction de longueur de l'hypocotyle jouent également un rôle important dans l'estimation de l'agressivité des souches.

La capacité de *P. halstedii* à surmonter des nouveaux gènes « *Pl* » de la résistance race-spécifique chez le tournesol (apparition de nouvelles virulences) est associée à une agressivité plus élevée. Nos résultats suggèrent l'existence d'un impact du mode de gestion des gènes *Pl* sur l'évolution de l'agressivité. En effet, seules les stratégies qui maintiennent des effectifs de plantes malades assez élevés favorisent une évolution de l'agressivité de *P. halstedii*. Donc, les données acquises sur l'évolution du pouvoir pathogène chez *P. halstedii* suggèrent que la durabilité de la résistance verticale ne serait jamais satisfaisante quel que soit son mode de gestion. Il apparaît très important de mettre en place rapidement des méthodes de lutte intégrées impliquant la résistance quantitative.

Mots clés : agressivité, gènes *Pl*, *Helianthus annuus*, résistance quantitative.

ABSTRACT

Variability of pathogenicity was studied in *Plasmopara halstedii* to provide a better insight into interactions between this obligate parasite and its host, sunflower (*Helianthus annuus*). The relations between new virulences and aggressiveness was analysed on a local population of *P. halstedii* under conditions of re-enforced infection and different selection pressures. Variability in aggressiveness was also studied on strains of the original race, (710) not showing virulence changes.

Two methodologies were developed:

- *The first was to obtain monozosporangial isolates, to study inter- and intra- pathotype variation.
- *The second was to define aggressiveness

Four aggressiveness criteria were defined and observed on 3 sunflower genotypes with different levels of quantitative resistance: the percentage of plants showing symptoms, length of latency period, sporulation density and reduction in hypocotyl length. Latency periods and sporulation densities were found to be the principal characters that could be used to define groups of *P. halstedii* strains according to their aggressiveness but percentage infection and reduction in hypocotyl length also varied between strains.

The capacity of *P. halstedii* to overcome race specific resistance in sunflower (*Pl* genes) was found to be associated with a high level of aggressiveness. The results indicate that the system of management of *Pl* genes has effects on evolution of aggressiveness. Only systems which lead to large numbers of diseased plants favour increases in aggressiveness. The data obtained suggest that use only of major gene resistance, whatever the management system, may never give satisfactory durable control. It appears very important to include quantitative resistance in integrated control systems.

Key words: aggressiveness, *Helianthus annuus*, quantitative resistance, *Pl* genes.